ENTWICKLUNGS- UND REGIOSPEZIFISCHES AUFTRETEN VON PROTEINEN IN AXONEN RETINALER GANGLIEN-ZELLEN DES HUHNS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

REINER BABIEL

aus Sigmaringen

1986

ENTWICKLUNGS- UND REGIOSPEZIFISCHES AUFTRETEN VON PROTEINEN IN AXONEN RETINALER GANGLIEN-ZELLEN DES HUHNS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

REINER BABIEL

aus Sigmaringen

1986

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 1985

Dekan: Prof. Dr. R. Hampp

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Bonhoeffer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Ammermann

aku-Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof.Dr. Friedrich Bonhoeffer am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie durchgeführt.

Prof. F. Bonhoeffer danke ich herzlich für die Förderung und die Diskussion der Untersuchungen. Dr. Claudia Stürmer, Dr. Wolf Reckhaus und Dr. Willi Halfter sowie Dr. Burkhard Schloßhauer möchte ich besonders für die zahlreichen Anregungen und kritischen Diskussionen danken, besonderer Dank auch Dr. Karlheinz Mann für Unterstützung bei der Zellkulturarbeit und seine Mühe bei der Anfertigung von Gefriermikrotomschnitten. Dr. Sigrid Henke-Fahle danke ich für die Einführung in die Hybridomatechnik und Dr. Fritz Rathjen für die kritische Verbesserung des Manuskripts. Nicht möglich gewesen wäre diese Arbeit ohne den Reinigungsservice von Frau Gotiani, Frau Krämer und Frau Rogic, die sterilen Medien von Frau Schoepe und die Unterstützung durch den Tierpfleger, Herrn Hegel, und unseren Hausmeister, Herrn Knauf. Allen weiteren Mitarbeitern Dank für die praktische Unterstützung der Arbeit und das gute Arbeitsklima. Herrn Franz Endres und den Mitarbeitern der Werkstatt schulde ich Dank für die rasche Anfertigung von Geräten. Bei Frau Roswitha Groemke-Lutz und dem Fotolabor bedanke ich mich für die Ausführung der fototechnischen Arbeiten, bei Frau Gunilla Weinraub für die Zeichnungen. Herzlichen Dank nicht zuletzt Frau Klara Ralinofsky für die Reinschrift des Manuskripts auf dem Schreibcomputer.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	ABKÜRZUNGEN	7
III.	MATERIAL UND METHODEN	8
1.	Versuchstiere	8
1.1.	Hühner	8
1.2.	Mäuse	8
1.3.	Fische	8
2.	Präparationen	9
2.1.	Präparation von Glykopeptiden	9
2.2.	Präparation von optischem Trakt	10
2.3.	Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation	10
2.4.	Deglykosilierung von Proteinfraktionen	10
3.	Immunologische Techniken	11
3.1.	Zellkultur von Hybridom- und Myelomzellen	11
3.2.	Immunisierung	11
3.3.	Zellfusionen und Selektion	12
3.4.	Klonierung	12
3.5.	Gewinnung von antikörperhaltigem Ascites	13
3.6.	ELISA	13
3.6.1.	Immunassay mit Glykopeptiden	13
3.6.2.	Subklassenbestimmung mit ELISA	14
3.7.	Proteinblot	14
3.8.	Immunhistologie	15
3.8.1.	Immunfluoreszenz auf Gefriermikrotom-schnitten	15
3.8.2.	Immunfluoreszenz auf Retinaexplantaten	16
4.	Analytische Techniken	16
4.1.	Elektrophorese	16
4.2.	Proteinbestimmung	16
4.3.	Kohlehydratbestimmung	16
4.4.	Aminosäurebestimmung	17
5.	Chemikalien	17
IV.	ERGEBNISSE	18
1.	Darstellung der Glykopeptide	18
2.	Immunisierung, Zellfusion und Etablierung der Zellinien	19
3.	Charakterisierung axonspezifischer Proteine durch monoklonale Antikörper	21

		Seite
3.1.	R1, ein Antigen, dessen Vorkommen in retinalen Axonen nicht entwicklungsabhängig ist	24
3.1.1.	Lokalisierung und altersunabhängige Verteilung des R1-Antigens in der Retina	24
3.1.2.	Vorkommen des R1-Antigens in anderen Bereichen des Nervensystems	27
3.1.3.	Speziesspzifität des Antigens	28
3.1.4.	Charakterisierung des R1-Antigens im Proteinblot	29
3.2.	R2, ein Antigen, das in der Retina entwicklungsabhängig auftritt und in vielen weiteren Fasertrakten vorkommt	30
3.2.1.	Lokalisierung und altersabhängige Verteilung des R2-Antigens im visuellen System	30
3.2.2.	Vorkommen des R2-Antigens in anderen Bereichen des Nervensystems	35
3.2.3.	Speziesspezifität des R2-Antigens	35
3.2.4.	Charakterisierung des R2-Antigens im Proteinblot	35
3.3.	R3, ein Antigen, das mit hoher Spezifität und altersabhängig in retinalen Axonen vorkommt	37
3.3.1.	Lokalisierung und altersabhängige Verteilung des R3-Antigens im visuellen System	37
3.3.2.	Vorkommen des R3-Antigens in anderen Bereichen des Nervensystems	42
3.3.3.	Speziesspezifität des R3-Antigens	42
3.3.4.	Charakterisierung des R3-Antigens im Proteinblot	44
3.4.	R4, ein entwicklungsabhängiges Antigen, das mit Vesikeln im Axon assoziiert ist	44
3.4.1.	Lokalisierung und altersabhängige Verteilung des R4-Antigens im visuellen System	45
3.4.2.	Verteilung des R4-Antigens in anderen Bereichen des Nervensystems	49
3.4.3.	Speziesspezifität des R4-Antigens	49
3.4.4.	Charakterisierung des R4-Antigens im Proteinblot	49
4.	Vergleich der R1-, R2-, R3- und R4-Antigene	50

Seite

V. DISKUSSION 55

VI. ZUSAMMENFASSUNG 74

VII. LITERATURVERZEICHNIS 75

LEBENSLAUF

I. EINLEITUNG

Während der Embryonalentwicklung des Nervensystems müssen axonale Fortsätze von Nervenzellen über teilweise recht weite Entfernung zu ihrem Zielgebiet in anderen Teilen des Nervensystems wachsen und dort Verbindungen mit bestimmten Zielzellen herstellen. Die für das gezielte Wachstum von Axonen verantwortlichen Mechanismen sind noch weitgehend ungeklärt. Das visuelle System des Huhns erscheint geeignet, die Entstehung neuronaler Verschaltungen und die zugrunde liegenden Prozesse während der Entwicklung zu untersuchen. Die Axone der retinalen Ganglienzellen wachsen zum Tectum und gehen dort Verbindungen mit bestimmten Neuronen so ein, daß eine topographische Projektion retinaler Orte auf das Tectum erreicht wird. Das bedeutet nicht nur, daß die retinalen Axone das Tectum finden und erkennen müssen, sondern die Axone benachbarter Ganglienzellen müssen darüber hinaus im Tectum benachbarte Terminationsareale aufsuchen.

Besondere Bedeutung für das Wachstum, die Orientierung und die Zielfindung von Axonen hat das speziell differenzierte distale Ende des Axons, der Wachstumskegel (Übersichtsartikel: Landis, 1984). Er ist von der Größe eines Neurons und unterscheidet sich vom Perikaryon durch seine langen zytoplasmatischen Fortsätze und seine amöbenhafte Beweglichkeit. Man nimmt an, daß Zytoskelettkomponenten, wie Aktin und Tubulin, die sich im Wachstumskegel finden, an der Motilität beteiligt sind.

Ein Axon wächst dadurch, daß das Material, das zu seiner Verlängerung benötigt wird, im Axon zum distalen Ende transportiert und dort in die Membran eingebaut wird (Bray, 1973).

Der Einbau des neuen Materials geschieht in unmittelbarer Nähe des Wachstumskegels (Feldman et al., 1981).

Damit das Axon wachsen kann, muß sich der Wachstumskegel an einer Oberfläche anheften können. Untersuchungen in Zellkultur zeigen, daß Wachstumskegel bevorzugt auf solchen Substraten wachsen, an die sie weder eine zu starke noch eine zu schwache Adhäsion haben (Letourneau, 1979).

Eine der wichtigsten Eigenschaften des Wachstumskegels ist es, das wachsende Axon zum richtigen Zielgebiet zu führen. Die Fähigkeit retinaler Axone, verschiedene Gebiete im Tectum zu unterscheiden, wurde durch in vivo-Experimente deutlich. Wird ein Teil der Retina operativ entfernt, wachsen die verbleibenden retinalen Axone nur auf den Teil des Tectums, den sie normalerweise innervieren würden (Crossland et al., 1974). In vielen weiteren Versuchen dieser Art wurde die Fähigkeit von Axonen demonstriert, ihre Umgebung zu erkennen und darauf zu reagieren (Übersichtsartikel: Cowan und Hunt, 1985). In in vivo-Versuchen sind Axone und Wachstumskegel verschiedenen Einflüssen ihrer Umgebung ausgesetzt, die teilweise gegensätzlich wirken und gleichzeitig auftreten können. Es ist daher schwierig, das Verhalten von Axonen und ihren Wachstumskegeln zu interpretieren und so Aufschluß über die Mechanismen zu erhalten, die an der Orientierung von Axonen beteiligt sind.

Neuere Untersuchungen, wie Axone wachsen und sich orientieren, werden deshalb oft in Zellkultur angestellt, da man dort Axone unter definierten Bedingungen beobachten kann. Die Entscheidungsfähigkeit von Wachstumskegeln retinaler Axone in Zellkultur zeigt sich, wenn ihnen als Substrat Zellen aus verschiedenen Regionen des Tectums angeboten werden (Bonhoef-

fer und Huf, 1982). Axone aus temporaler Retina wachsen bevorzugt auf Zellen aus anteriorem Tectum. Das entspricht ihrem normalen Terminationsgebiet. Nasale Axone wachsen auf allen tectalen Zellen gleich gut. Daraus folgt, daß die Erkennungsfähigkeit der Wachstumskegel von ihrer regionalen Herkunft in der Retina abhängt und daß die Axone verschiedene Substrate unterscheiden können.

Neben der Wechselwirkung von Wachstumskegeln mit Oberflächensubstanzen wurden weitere Mechanismen, die möglicherweise an der Orientierung von Axonen beteiligt sein könnten, in Zellkultur gezeigt. Dazu gehören die Orientierung in Konzentrationsgradienten diffusibler Stoffe, in elektrischen Feldern und an mechanischen Leitstrukturen.

Welchen Einfluß zeitabhängige Prozesse auf die Ausbildung der retinotectalen Projektion haben, ist umstritten. Das zeitlich und damit räumlich sequentielle Wachstum retinaler Axone und die zeitlich geordnete Reifung tectaler Zielstrukturen im Huhn wurde als hinreichende Bedingung für die Entstehung der topographischen Projektion angesehen (Rager, 1980). Im visuellen System von Daphnia verändert sich die Projektion, wenn die Abfolge der Neuronendifferenzierung experimentell verzögert wird (Macagno, 1981). Ob die Reihenfolge der Innervation des Tectums durch retinale Axone an der Entstehung der topographischen Projektion beteiligt ist, wurde in Xenopus untersucht. Hier verlassen die Axone normalerweise die dorsale Retina zuerst und erreichen auch das Tectum vor den Axonen der ventralen Retina. Eine Umkehr dieser zeitlichen Folge durch experimentelle Eingriffe, bei denen älteres Gewebe in die dorsale Retina transplantiert wurde, scheint die initiale, retinotope Projektion der Axone nicht zu beeinflussen (Holt, 1984).

Über Moleküle, die am Wachstums- und Entscheidungsverhalten von Axonen beteiligt sind, ist nur wenig bekannt. Es besteht jedoch die Vermutung, daß es in der Zellmembran des Wachstumskegels Rezeptoren gibt, die an der Wechselwirkung mit Oberflächen in der Umgebung (andere Axone, extrazelluläre Matrix, gliale Zellen etc.) beteiligt sind. Eine direkte Isolierung solcher Moleküle mit konventionellen biochemischen Fraktionierungstechniken erscheint wenig erfolgversprechend, da die erzielten Anreicherungen mit diesen Methoden zu gering sind.

Ein anderer Weg, Differenzierungseigenschaften molekular zu untersuchen, ist die Verwendung spezifischer Antikörper (Beug et al., 1970). Konventionell produzierte Antiseren scheinen zur Untersuchung der an Wachstum und Orientierung beteiligten Moleküle nicht so gut geeignet, da Material zur Immunisierung nur in geringer Reinheit zur Verfügung steht.

Die Herstellung monoklonaler Antikörper eröffnete einen neuen Ansatz, Moleküle zu suchen, die spezifisch mit der Entwicklung des Nervensystems assoziiert sind. Man kann mit Mischungen von Stoffen immunisieren und erhält bei geeigneter Selektion der Hybridomzellen in Klone Antikörper, die nur eine bestimmte Stelle eines Moleküls erkennen (Köhler und Milstein, 1975). Immunhistochemische und biochemische Techniken erlauben es, das Vorkommen dieses Moleküls in bestimmten Geweben, Zellen und subzellulären Fraktionen zu untersuchen. Die Isolierung des Moleküls ist in vielen Fällen über Immunaffinitätschromatographie mit dem Antikörper möglich.

Mit Hilfe von Antikörpern wurden in den letzten Jahren mehrere Glykoproteine mit hohem Molekulargewicht charakterisiert, die an der Wechselwirkung von Zellen und Axonen betei-

ligt sind (Übersichtsartikel: Edelman, 1985).

Zelltypspezifische Glykoproteine, die sich durch eine für das jeweilige Antigen charakteristische Kohlehydratstruktur auszeichnen, wurden auch bei der Untersuchung von tumorassoziierten Zelloberflächenantigenen gefunden (Feizi, 1985). Der Kohlehydratanteil von Glykoproteinen scheint auch bei der zellulären Wechselwirkung von Dictyostelium eine Rolle zu spielen (Springer und Barondes, 1985). Axone aus verschiedenen Bereichen des Nervensystems scheinen unterschiedliche Glykosylreste an ihrer Oberfläche zu tragen. Sie unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, Lektine zu binden (Pfenninger et al., 1984). Es besteht daher die Vermutung, daß der Kohlehydratanteil von Glykoproteinen auch an Erkennungsprozessen im Nervensystem und den damit verbundenen Entscheidungen beteiligt ist. Mit Antikörpern, die gegen den Kohlehydratanteil von Glykoproteinen gerichtet sind, könnte diese Hypothese überprüft werden.

Optischer Nerv und Trakt des embryonalen Huhns bestehen fast ausschließlich aus Axonen, Zellen sind nur in geringem Maße vorhanden. Es wurde gezeigt, daß Axone und Perikaryen von Nervenzellen unterschiedliche Proteine besitzen (Schloßhauer, 1985). Es ist daher zu erwarten, daß bei Immunisierungen mit optischem Trakt bevorzugt Antikörper gegen Proteine gebildet werden, welche in Axonen angereichert vorkommen (Henke-Fahle, 1983; Schloßhauer, 1985).

Die Hybridomatechnik wurde auch in der hier vorliegenden Arbeit zur Suche nach Antikörpern benützt, die Moleküle erkennen, die in Axonen und Wachstumskegeln angereichert sind. Dazu wurden Mäuse mit Glykopeptiden aus Hühnchengehirn und optischem Trakt immunisiert. Die primären Fusionskulturen wurden

im ELISA und mit Hilfe der Immunfluoreszenz auf Ganzkopfschnitten von 7 Tage alten Hühnchenembryonen getestet.

Vier Antikörper, die in der Immunfluoreszenz spezifisch retinale Axone färben und im Proteinblot unterschiedliche Moleküle erkennen, werden beschrieben. Drei axonspezifische Antikörper zeigen eine topographische Änderung in der Expression des Antigens im Zeitraum E5 bis E14. Ein weiterer axonspezifischer Antikörper, dessen Bindung an Axone im selben Zeitraum keine topographische Änderung zeigt, wird ebenfalls beschrieben. Die Arbeit stellt die Spezifität der Antikörper im visuellen System, in anderen Teilen des Nervensystems und die biochemische Charakterisierung im Proteinblot vor.

II. ABKÜRZUNGEN

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
BSA	Rinderserumalbumin
Da	Dalton
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-Immunassay
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAM	Ziege-gegen-Maus-Antikörper
HAT-RPMI	Selektionsmedium mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
kDa	Kilodalton
KLH	Keyhole limpet Hemocyanin
Mr	Molekulargewicht
NbCS	Newborn Calf Serum
nR	nasale Retina
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PVC	Polyvinylchlorid
RAM	Kaninchen-gegen-Maus-Antikörper
RPMI	Rowell Park Memorial Institute Medium 1640
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Saline
TES	(N-tris-(Hydroxymethyl)methyl-2-aminoäthansulfonsäure
tR	temporale Retina
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

1.1. Hühner

Befruchtete Hisex-Bruteier wurden im Brutschrank bei 37°C und 65% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die angegebenen Entwicklungsstadien der Embryonalentwicklung der Hühner (E5-E14) entsprechen der Brutdauer in Tagen. Embryonale Hühner dieser Stadien wurden für Präparationen (2.1.-2.4.), zur Anfertigung von Gefrierschnitten (3.8.1.) und zur Charakterisierung von Antikörpern im Proteinblot (3.7.) verwendet.

1.2. Mäuse

Für die Immunisierungen und zur Vermehrung von Hybridomzellen als Ascitestumor wurden Mäuse des Stammes Balb/cByJ verwendet. Sie wurden ursprünglich von den Jackson Laboratories, USA, bezogen und dann im Institut weitergezüchtet. Für Makrophagenpräparationen wurden Mäuse des Stammes C57 Black verwendet, die ebenfalls aus eigener Zucht stammten.

1.3. Fische

Ein Präparat eines Goldfisches (Länge 6 cm), das die Augen, den optischen Nerv und den Trakt sowie das Tectum enthielt, wurde mir freundlicherweise von Dr. C. Stürmer zur Verfügung gestellt. Es wurden davon Gefrierschnitte in der Horizontalebene (parallel zum Verlauf des Nervs), wie in 3.8.1. beschrieben, hergestellt.

2. Präparationen

2.1. Präparation von Glykopeptiden

Die Präparation von Glykopeptiden erfolgte nach der von Finne und Krusius (1982) beschriebenen Methode. 15 Gehirne von E10 Hühnchen wurden in 60ml isotonischem Saccharosepuffer (0.32M Saccharose, 1mM $MgCl_2$, 5mM TES, pH 7.3) homogenisiert. Das Homogenat wurde 5min bei 1600g und 4°C im HB4-Rotor der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand der ersten Zentrifugation wurde 30min bei 20.000g und 4°C im HB4-Rotor zentrifugiert. Der bei der zweiten Zentrifugation erhaltene Überstand wurde verworfen, das Sediment stellte eine grobe Membranpräparation dar. Die Membranen wurden in 3 Vol. H_2O suspendiert (etwa 2mg Protein/ml) und unter Schütteln mit 8 Vol. Methanol und mit 4 Vol. Chloroform versetzt. Die Suspension wurde 30min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend 15min bei 15.000g im HB4-Rotor zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in H_2O/Methanol/Chloroform (3:8:4, v/v/v) resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in absolutem Äthanol suspendiert und wie oben zentrifugiert. Das Sediment wurde danach 30min lyophilisiert und gewogen. Diese Membranproteinpräparation wurde mit Äthanol benetzt und in Proteolysepuffer (1mM $CaCl_2$, 0.1M Tris, pH 8.0) mit einer Proteinkonzentration von 30mg/ml suspendiert. Pronase (Serva) wurde ebenfalls in Proteolysepuffer gelöst (5mg/ml) und 30min bei 60°C vorinkubiert. Die Membranen wurden anschließend mit 5% Pronase bei 60°C verdaut. Nach 24 Std. wurde frische Pronase in gleicher Menge zugegeben und weitere 24 Std. bei 60°C inkubiert. Als bakteriostatischer Zusatz wurde von Beginn des enzymatischen Abbaues an 0.5% Toluol

zugegeben. Die Reaktion wurde durch Erhitzen des Ansatzes (5min, 100°C) beendet. Das Reaktionsgemisch wurde dann 10min bei 3000 UpM in der Christ-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Sephadex G25 in 10mM Pyridin-Acetat, pH5.5 (Säulengröße 60x2cm, v = 30cm/h) chromatographiert. Die Fraktionen wurden auf Proteinkonzentration, Gesamthexosekonzentration und Aminosäurekonzentration analysiert. Die Fraktionen mit einem hohen Kohlehydrat-Protein-Verhältnis wurden zusammengegeben und anschließend lyophilisiert.

2.2. Präparation von optischem Trakt

Optischer Trakt von E9-Hühnern wurde präpariert, wie von Schloßhauer (1985) beschrieben.

2.3. Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation

Tecta von E10 Hühnchen wurden in isotonischem Saccharosepuffer (2.1.) homogenisiert. Das Homogenat wurde 5min bei 1.600g und 4°C im HB4-Rotor in der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde 30min bei 15.000g im HB4-Rotor zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation verblieben die löslichen Bestandteile der Zelle im Überstand, er wird im weiteren als lösliche Fraktion bezeichnet. Der Niederschlag stellte eine rohe Membranpräparation dar und wird als Membranfraktion bezeichnet.

2.4. Deglykosilierung von Proteinfraktionen

Tecta von E10 Hühnchen wurden in 7M Harnstoff, 1mM EDTA, 0.005mM PMSF, 20mM Acetatpuffer, pH 5.0, homogenisiert und auf Eis für 15min extrahiert. Das Homogenat wurde 20min bei 100.000g im Ti50-Rotor zentrifugiert und die gelöste Phase

abgenommen. Die Proteinkonzentration wurde auf 1mg/ml eingestellt. Ein Aliquot des Überstandes wurde mit Natriumperjodat versetzt (Endkonzentration 20mM) und die Probe, sowie eine Kontrolle ohne $NaJO_4$, für 30min bei 37°C inkubiert (Spiro, 1966b). Die Reaktion wurde durch das Glycerin im Probenpuffer beendet.

3. Immunologische Techniken

3.1. Zellkultur von Hybridom- und Myelomzellen

Die Zellfusionen wurden mit der Myelomzellinie P3-X36O-Ag8-65/3 (Kearny et al., 1979) durchgeführt. Myelom- und Hybridomzellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS kultiviert. Die Kulturbedingungen zur Erhaltung der Zellinien entsprachen denen von Saumweber (1980) und sind dort ausführlich beschrieben.

3.2. Immunisierung

Zur Immunisierng von zwei Mäusen wurden Glykopeptide von Hühnergehirnen, für zwei weitere Mäuse wurde optischer Trakt von embryonalen Hühnern verwendet. Ein Milligramm lyophilisierte Glykopeptidpräparation (s.2.1.) wurde in 0.5ml PBS gelöst und mit 0.5ml komplettem Freund´s Adjuvans (Gibco) emulgiert. Die Mischung wurde an den Tagen 1, 14 und 21 intraperitoneal (i.p.) in Balb/c-Mäuse (s.1.2.) injiziert. Am Tag 24 wurden 0.5mg der Glykopeptidpräparation in 0.5ml PBS i.p. injiziert. Bei den Immunisierungen mit optischem Trakt wurden 5 Trakte von Hühnern des Stadiums E9 (s.2.2.) in 0.5ml PBS homogenisiert und mit 0.5ml komplettem Freund´s Adjuvans emulgiert. Das Stimulationsschema entsprach dem für die Glykopeptide

verwendeten, und die letzte Injektion erfolgte ebenfalls ohne Adjuvans.

3.3. Zellfusionen und Selektion

Die Zellfusion von Myelomzellen und stimulierten Lymphozyten erfolgte nach der von Pontecorvo (1975) entwickelten und von Saumweber (1980) ausführlich beschriebenen Methode. Mit den Lymphozyten aus der Milz einer Maus wurden 4 Teilfusionen durchgeführt. Eine Fusion wurde in 3 Gewebekulturplatten (Greiner, je 96x0.1ml) mit 10^5 Makrophagen je Milliliter HAT-RPMI mit 20% FCS (Fazekas und Scheidegger, 1980) verteilt. Nach 3 Tagen wurden weitere 0.1ml HAT-RPMI zugegeben. Der Zellkultur-Überstand wurde mittels ELISA (s.3.6.1.) getestet, wenn die Farbe des Kulturmediums sich von rot nach orange (es enthält Phenolrot als pH-Indikator) geändert hatte (ca. 8-10 Tage). Die dafür entnommenen 0.1ml Zellkulturüberstand wurden durch frisches HAT-RPMI mit 20% FCS ergänzt. Zellkulturüberstand von Zellinien, die sich im ELISA als positiv erwiesen, wurden in der indirekten Immunfluoreszenz auf Kryostatschnitten von Hühnerköpfen (E7) getestet. Zellinien, die einen Antikörper produzierten, der selektiv die optische Faserschicht der Retina färbte, wurden weiter kultiviert und durch Klonierung stabilisiert.

3.4. Klonierung

Zur Klonierung wurden die Hybridomzellen resuspendiert und die Zelldichte auf ca. 10 Zellen/ml eingestellt. Zehn Milliliter dieser Zellsuspension wurden auf eine Gewebekulturplatte (96x0.1ml) verteilt (Goding, 1980). Der weitere Ver-

lauf der Klonierung der Hybridomzellen erfolgte, wie bei Henke-Fahle (1983) beschrieben. Teilweise wurden Klonierungen auch nach der von Metcalf (1977) beschriebenen und von Saumweber (1980) modifizierten Klonierung in Softagar durchgeführt.

3.5. Gewinnung von antkörperhaltigem Ascites

Die Gewinnung antikörperhaltigen Ascites in Mäusen des Stammes Balb/cByJ erfolgte, wie von Symmons (1983) beschrieben.

3.6. ELISA

3.6.1. Immunassay mit Glykopeptiden

Die Bindung der Antikörper an Glykopeptide wurde in einem abgewandelten Festphasen-ELISA getestet, in dem die Glykopeptide durch Glutaraldehyd an die Festphase gebunden waren (Ewen, 1984). Die PVC-Mikrotiterplatten wurden 30min mit 0.1ml 0.25% Glutaraldehyd in TBS (25mM Tris-HCl, 144mM NaCl, pH 8.1) je Loch inkubiert. Dann wurde die Platte entleert und einmal mit kaltem TBS gewaschen. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden 0.1ml der Glykopeptidlösung mit 0.2mg Oligosaccharid/ml gegeben und die Platte 12 Std. bei 4°C inkubiert. Die Glykopeptidlösung wurde dann entnommen und zur Beschichtung einer weiteren Mikrotiterplatte in gleicher Weise verwendet. Anschließend wurde die Platte dreimal mit TBS gewaschen. Die verbleibende Proteinbindungskapazität wurde für eine Stunde mit TBS/NbCS (4:1; v/v) abgesättigt. Die so vorbereiteten Platten wurden bei -20°C gelagert. Zum Test wurden sie aufgetaut und jede Vertiefung mit 0.1ml Hybridoma-Zellkul-

turüberstand und 0.1ml 1% Tween 80 über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden anschließend ausgegossen und die Platte dreimal mit TBS gewaschen. Dann wurde in jede Vertiefung 0.05ml Antikörperlösung (GAM-Peroxidase; Dianova, Hamburg; 1:4000 in TBS/0.1% Tween 80) gegeben und 4 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Färbung mit Orthophenylendiamin erfolgte nach Babiel (1983).

3.6.2. Subklassenbestimmung mit ELISA

Zur Standardisierung wurden monoklonale Antikörper verwendet, deren Subklasse durch den Ouchterlony-Diffusionstest bestimmt war. Sie wurden mir freundlicherweise von M.Frasch zur Verfügung gestellt. Die antikörperhaltigen Zellkulturüberstände wurden 1:1000 in PBS verdünnt und 0.1ml je Vertiefung in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde dann nach einer Stunde entleert und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde 30min mit 1% BSA in PBS inkubiert. Zur Auswertung wurden klassen- und subklassenspezifische Antikörper verwendet, die mit Peroxidase gekoppelt sind (GAM-IgG und GAM-IgM von Dianova; RAM-IgG1, RAM-IgG2a und RAM-IgG3 von Miles). Die klassenspezifischen Antikörper wurden 1:1000 und 1:4000 und die subklassenspezifischen Antikörper 1:100 und 1:400 in PBS/Tween verdünnt. Mit den zweiten Antikörpern wurde 14 Std. bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit PBS wurde die Anfärbung wie beschrieben durchgeführt (Babiel, 1983).

3.7. Protein-Blot

Der immunologische Nachweis von elektrophoretisch getrennten Proteinen nach Transfer auf Nitrozellulose (Towbin,

1978) wurde durchgeführt wie beschrieben (Babiel, 1983).

3.8. Immunhistologie

3.8.1. Immunfluoreszenz auf Gefriermikrotomschnitten

Der immunhistologische Nachweis von Antigenen wurde auf mit Paraformaldehyd fixierten Kryostatschnitten von embryonalen Hühnerköpfen durchgeführt. Köpfe von Hühnerembryonen verschiedenen Alters wurden dazu für 8 Std. in 4% Paraformaldehyd und 11.5% Saccharose in PBS fixiert und anschließend über Nacht in 25% Saccharose inkubiert. Zur besseren Durchdringung des Gewebes mit Paraformaldehyd wurden bei 11 Tage alten und älteren Embryonen nur halbe Köpfe verwendet. Das Gewebe wurde dann mit Tissue-Tek (Miles) direkt auf dem Objekthalter des Gefriermikrotoms (Reichert-Jung, Nußloch) aufgefroren und in der Horizontalebene des Kopfes bei -20°C in 14µm starke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden auf mit 0.5% Gelatine/0.05% Chromalaun beschichteten Objektträgern aufgenommen. Die Färbung mit monoklonalem Antikörper und fluoreszenzmarkiertem zweiten Antikörper (GAM-IgG/IgM-FITC, Dianova) wurde, wie bei Henke-Fahle (1983) beschrieben, durchgeführt.

Die Schnitte wurden in einem Zeiss-Universalmikroskop, ausgerüstet mit Epifluoreszenz (Anregung 450-490nm, Farbteiler 510nm, Langpaß 520nm) und den Zeiss-Objektiven Plan 2,5x/0,08, Neofluar 6,3x/0,20, Neofluar 10x/0,30, Phase 2-Neofluar 40x/0,75, betrachtet und ausgewertet. Photographiert wurde mit einer Olympus OM2 auf Ilford HP5-Film. Neben der spezifischen grünen FITC-Fluoreszenz zeigen manche Gewebe (besonders die Photorezeptorschicht in der Retina und die Epidermis) manchmal eine gelbe Autofluoreszenz. Auf den Bildern erscheint diese

antikörperunabhängige Fluoreszenz ebenfalls als Färbung.

3.8.2. Immunfluoreszenz an Retinaexplantaten

Explantate von E6 Hühnchenretina wurden angefertigt wie von Halfter (1983) beschrieben. Als Kulturmedium wurde F12-Medium (GIBCO) mit den von Schloßhauer (1985) beschriebenen Zusätzen verwendet. Die Färbung der auf Kollagen auswachsenden Axone mit Antikörper erfolgte, wie von Schloßhauer (1985) beschrieben. Die Explantate wurden in einem inversen Zeiss-Mikroskop mit Epifluoreszenz (Filter s. 3.8.1.) und den Objektiven Neofluar 6,3x/0,20 und Phase 2-Neofluar 25x/0,60 betrachtet und, wie in 3.8.1. beschrieben, photographiert.

4. Analytische Techniken

4.1. Elektrophorese

Elektrophoretische Trennungen in SDS-Polyacrylamidgelen wurden in dem von Laemmli (1970) beschriebenen System durchgeführt. Die Acrylamidkonzentration in den Trenngelen betrug 7%. Eine ausführliche Beschreibung findet sich bei Babiel (1983).

4.2. Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Rylatt und Parish (1982) und der Methode von Sonne und Simpson (1982) bestimmt.

4.3. Kohlehydratbestimmung

Die Gesamthexose-Konzentration wurde mit der Anthron-Reaktion (Spiro, 1966a) bestimmt. Dazu wurde 1ml einer 0.02-1mM kohlehydrathaltigen Lösung mit 5ml Anthron-Reagens (0.05% Anthron, 1% Harnstoff in 70% H_2SO_4) versetzt, gemischt und 15min auf 100°C erhitzt. Die Proben wurden in Wasser auf

Raumtemperatur abgekühlt und nach 20min bei 620nm gegen einen Leerwert gemessen. Zur Kalibrierung wurde Zellobiose verwendet.

4.4. Aminosäurebestimmung

Die Vollständigkeit der Proteolyse der Membranfraktion wurde mit Ninhydrin-Reagens (Merck, Darmstadt) bestimmt. Dazu wurden nach der Chromatographie der pronasebehandelten Membranfraktion 5µl jeder Fraktion auf eine Kieselgelplatte getüpfelt. Nach dem Trocknen wurde die Platte mit Ninhydrin-Reagens besprüht und 5min bei 105°C entwickelt.

5. Chemikalien

Alle, nicht näher bezeichneten Chemikalien stammen von Merck, Darmstadt, und wurden in der höchsten zur Verfügung stehenden Qualität verwendet. Außer Mercaptoäthanol (Fluka, Neu-Ulm) wurden die Reagentien für die Elektrophorese von BioRad, München, bezogen. Polyäthylenglykol 4000 lieferte die Firma Roth, Karlsruhe; Tween 80, Aminopterin, Hypoxanthin und Thymidin stammten von Serva, Heidelberg.

1. Darstellung der Glykopeptide

Aus Gesamtgehirnen von E10-Hühnchenembryonen wurde eine Membranfraktion gewonnen. Diese Fraktion enthielt etwa 10% des Gesamtproteins. Die Membranfraktion wurde mit Pronase verdaut, um Proteine und den Proteinanteil von Glykoproteinen abzubauen (s. III,2.1.).

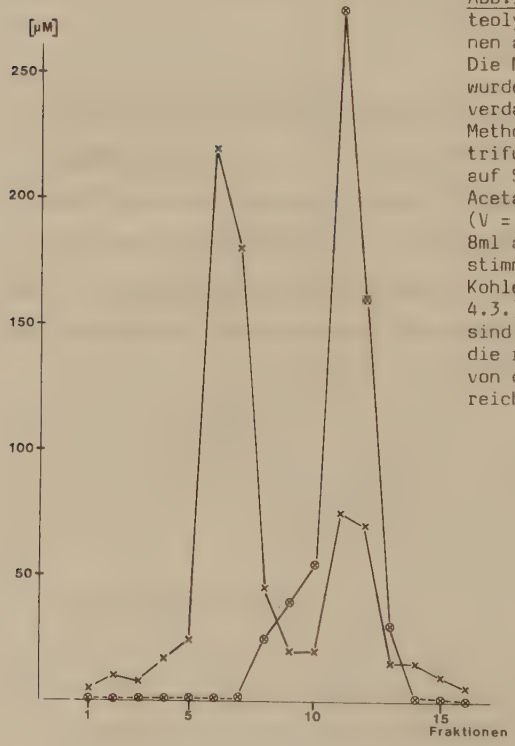


Abb.1 Gelfiltration eines Proteolyseansatzes von Gehirnmembranen auf Sephadex G25.
Die Membranen von 15 E10-Gehirnen wurden präpariert und mit Pronase verdaut, wie in Material und Methoden beschrieben. Nach Zentrifugation wurde der Überstand auf Sephadex G25 in 10mM Pyridin-Acetat, pH 5.5, chromatographiert (V = 30cm/h) und in Fraktionen zu 8ml aufgefangen. x = Proteinbestimmung (s. III, 4.2.), O = Kohlehydratbestimmung (s. III, 4.3.). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 3 Ansätzen, die relative Standardabweichung von den Mittelwerten ist im Bereich von ±10%.

Die Gelfiltration der verdauten Membranpräparation ergab 3 Hauptfraktionen: Unverdautes Protein und Enzym liefen im Ausschlußvolumen (Fraktion 5-8, Abb.1). Diese Hauptfraktion war durch ein niedriges Monosaccharid-Aminosäure-Verhältnis gekennzeichnet (<< 1). Fraktion 9-13 enthielt die Glykopeptide, deren molares Monosaccharid-Aminosäure-Verhältnis 1:1 oder größer war (Hauptfraktion 2, Abb.1). In Fraktion 20-25 wurden die Aminosäuren und Oligopeptide eluiert (nicht gezeigt). Die Fraktionen mit einem Monosaccharid-Aminosäure-Verhältnis von 1:1 oder größer wurden gesammelt und lyophilisiert. Diese Fraktion hatte ein durchschnittliches Monosaccharid-Aminosäure-Verhältnis von 2,5:1 und ein Molekulargewicht von 6.000D. Die Ausbeute der Glykopeptidpräparation betrug etwa 1% der Proteinmenge der Membranfraktion. Die so gewonnene Glykopeptidfraktion wurde für die Immunisierungen und Immunassays verwendet.

2. Immunisierung, Zellfusionen und Etablierung der Zellinien

Zwei Mäuse wurden mit Glykopeptiden, die durch Proteolyse aus einer Membranfraktion von embryonalem Hühnergehirn gewonnen wurden (s. III, 2.1.), immunisiert. Zwei weitere Mäuse wurden mit optischem Trakt immunisiert (s. III, 2.2.). Die Lymphozyten aus den Milzen dieser 4 Mäuse wurden für Fusionsexperimente verwendet (s. III, 3.3.). In den Fusionen GP1, OT1 und OT2 wuchsen in über 90% der ausgesäten Kulturen Hybridzellen. In der Fusion der zweiten Milz, die mit Glykopeptiden stimuliert worden war, wuchsen nur in 30% der angelegten Kulturen Hybridzellen (Tab.1). Die Zellkulturüberstände der Primärkulturen von allen Fusionen wurden im ELISA auf immobilisierten Glykopeptiden getestet. Positive Überstände liefer-

ten ein dreifach höheres Signal im ELISA als der zur Standardisierung verwendete monoklonale Mausantikörper mit Spezifität gegen KLH. Im ELISA positive Zellkulturüberstände von Primärkulturen wurden dann auf formaldehydfixierten Gefriermikrotomschnitten von E7-Hühnerköpfen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz getestet. Bei der Fusion OT1 und OT2 wurden auch Zellkulturüberstände, die im ELISA nicht positiv waren, mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Antikörper, die spezifisch retinale Axone färbten, wurden weiter kloniert. Die Ergebnisse der Fusionsexperimente sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Auswertung der Fusionsexperimente

Fusion	Antigen	Gesamtzahl d. Hybridomkulturen	ELISA-positive Kulturen	Immunfl.-positive Kulturen	Faser-Spezifität
GP1	Glykopeptid	> 1100	222	103	7
GP2	Glykopeptid	ca.400	90	24	-
OT1/OT2	Opt. Trakt	> 1800	360	288	48

In allen Fusionsexperimenten zeigten etwa 20% der Kulturen eine positive Reaktion im Enzymimmunassay. Um die Vollständigkeit der durch das Enzymassay erfaßten Kulturen zu untersuchen, wurden 25 Zellkulturüberstände von wachsenden Hybridomkulturen der Fusion GP1, die im ELISA negativ waren, in der indirekten Immunfluoreszenz getestet. Sie zeigten alle keine Anfärbung. Bei dieser Fusion wurden deshalb nur im Enzymassay positive Kulturen in der Immunfluoreszenz untersucht. Die Untersuchung von Zellkulturüberständen der Fusion

OT1/2 in der Immunfluoreszenz zeigte, daß sie viele antikörperhaltige Überstände enthielten, die eine spezifische Immunfluoreszenz auf neuronalem Gewebe zeigten, obwohl sie im ELISA negativ waren. Wegen der große Menge der Kulturen konnten jedoch nur die Kulturüberstände von ca. 1200 wachsenden Hybridomlinien in der Immunfluoreszenz getestet werden.

3. Charakterisierung axonspezifischer Proteine durch monoklonale Antikörper

Die axonspezifischen Antikörper wurden in Schnitten auf E5-, E7- und E9-Hühnerköpfen auf die entwicklungsabhängige Expression der entsprechenden Antigene getestet. Drei Antikörper - R2, R3 und R4 -, binden an Antigene, die in diesem Zeitraum entwicklungsabhängig in unterschiedlichen Bereichen der Retina auftreten. Sie wurden weiter untersucht. Zur besseren Veranschaulichung wird zunächst ein weiterer axonspezifischer Antikörper - R1 - beschrieben, dessen Antigen in Axonen altersunabhängig vorkommt.

Ursprünglich wurden die antikörperproduzierenden Hybridomlinien nach der Primärkultur bezeichnet, in der sie nach der Fusion wuchsen. Die entsprechenden Bezeichnung sind: R1 = XVI 12D, R2 = XIV 12C, R3 = IX 11F, R4 = XI 5C.

Für jeden dieser Antikörper werden im folgenden beschrieben:

1) seine Färbeeigenschaften auf Gefriermikrotomschnitten von Hühnerköpfen der Entwicklungsstadien E5 - E14 mit Betonung des retinotectalen Systems,
2) die Anfärbung *in vitro* kultivierter retinaler Axone,
3) seine Kreuzreaktionen mit Axonen aus anderen Bereichen

des Nervensystems,

4) die Charakterisierung des Antigens im Proteinblot,

5) die Speziesspezifität des Antikörpers.

Ein Horizontalschnitt durch einen Hühnerkopf zeigt das visuelle System des Huhns am Embryonaltag 9 (Abb.2). Im oberen Bildteil sind die beiden Augen zu erkennen, sie sind durch das Pigmentepithel begrenzt. Im Augenhintergrund, gegenüber der Linse, liegt die Fissur. Hier münden im linken Auge die Axone der nasalen optischen Faserschicht von oben und die der temporalen optischen Faserschicht von unten. Die Axone der retinalen Ganglienzellen bilden dann den optischen Nerv. Im Chiasma überkreuzen sich die beiden Nerven und ziehen zum jeweils gegenüberliegenden Tectum. Die paarigen Tecta sind als Halbbögen am unteren Bildrand zu erkennen. In der obersten Schicht des Tectums wachsen die Axone der retinalen Ganglienzellen zu ihrem Zielgebiet, um dort in tieferen Schichten funktionelle Verbindungen herzustellen. Sichtbar ist auch das Pekten, ein konisches Gebilde, das von der Papille aus in die Linse hineinragt. Das Pekten ist vaskularisiert und dient wahrscheinlich der Ernährung der Retina. Die Orientierung der folgenden Abbildungen mit Immunfluoreszenzdarstellungen entspricht der in Abb.2 gezeigten.

Abb.2: E9-Ganzkopfschnitt vom Huhn.
Die Schnittebene verläuft horizontal zum optischen Nerv und Trakt. In der oberen Bildhälfte sind die beiden Augen, in der unteren die beiden Tecta zu erkennen. Oben in der Mitte sind der Schnabel und die Nasenepithelien abgebildet.
Bezeichnungen: A = Auge, nR = nasale Retina, tR = temporale Retina, P = Pigmentepithel, F = Fissur, L = Linse, Pk = Pekten, ON = optischer Nerv, Ch = Chiasma, OT = optischer Trakt, T = Tectum, SO = Stratum opticum, V = Ventrikel, C = Cornea.

3.1. R1, ein Antigen, dessen Vorkommen in retinalen Axonen nicht entwicklungsabhängig ist

Die antikörperproduzierende Hybridomzellinie entstammt einer Fusion von Ag8-Myelomzellen mit Lymphozyten einer Maus, die mit Glykopeptiden aus E10 Hühnergehirn immunisiert worden war. Der antikörperhaltige Zellkulturüberstand bindet an Glykopeptide, die an Mikrotiterplatten immobilisiert wurden (nicht gezeigt), in der Immunfluoreszenz auf E7-Retinaschnitten färbte er spezifisch die optische Faserschicht. Der Antikörper gehört der Immunglobulinklasse IgG3 an.

3.1.1. Lokalisierung und altersunabhängige Verteilung des R1-Antigens in der Retina

Der R1-Antikörper färbt auf Gefriermikrotomschnitten von fixierter Retina (E5) nur die Axone der Ganglienzellen (Abb.3a,7a). In der nasalen optischen Faserschicht werden nur Axone im zentralen Bereich der Retina gefärbt, während in der temporalen optischen Faserschicht auch Axone im peripheren Bereich gefärbt werden. Auf E7-Retina färbt der Antikörper ebenfalls nur Axone. Die temporale optische Faserschicht ist dichter gepackt und erscheint dadurch stärker gefärbt als die nasale optische Faserschicht (Abb.3b). Auch in noch späteren Entwicklungsstadien, in denen bereits die innere plexiforme Schicht deutlich ausgebildet ist (E9), ist die Färbung noch auf die optische Faserschicht beschränkt (Abb.3c). Die nasalen und temporalen Axone erscheinen etwa gleich stark angefärbt. Im Stadium E14 ist in der Retina ebenfalls die optische Faserschicht vollständig gefärbt, zusätzlich findet man jetzt noch eine schwache Anfärbung des äußeren Bereiches der inneren plexiformen Schicht. Gefärbt erscheinen auch zwei Bänder im

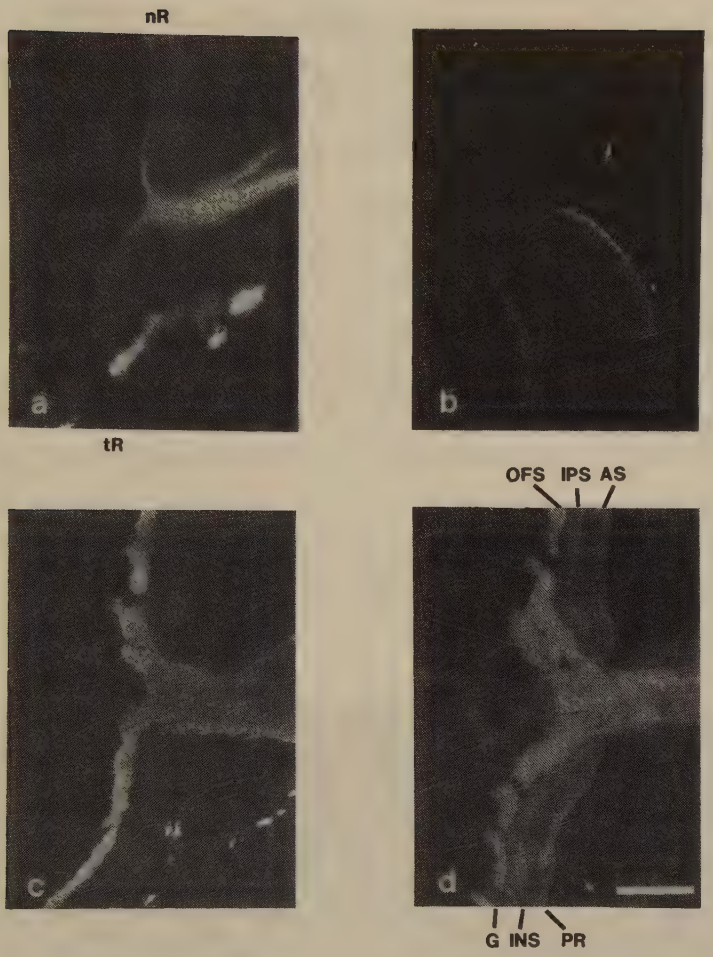


Abb.3: Lokalisierung des R1-Antigens in Retinaschnitten verschiedenen Alters.
(a) E5-Retina, (b) E7-Retina, (c) E9-Retina, (d) E14-Retina. Die Lage der verschiedenen Schichten ist an der E14-Retina angegeben.
Der Antikörper färbt in frühen Stadien (bis E9) ausschließlich die Axone der Ganglienzellen. In späteren Entwicklungsstadien findet man zusätzlich noch eine schwache Färbung im äußeren Bereich der inneren plexiformen Schicht. Eine gelbe, von Antikörpern unabhängige Fluoreszenz im Bereich der Photorezeptorschicht erscheint in der Abbildung als gefärbte Schicht (s. III, 3.8.1.). Bezeichnungen: OFS = optische Faserschicht, G = Ganglienzellschicht, IPS = innere plexiforme Schicht, INS = innere nukleäre Schicht, AS = äußere plexiforme und nukleäre Schicht, PR = Photorezeptorschicht.
Maßstab: 250µm, Objektiv: 6,3x.

Bereich der Photorezeptorschicht, diese Färbung ist jedoch unspezifisch und nicht durch Antikörperbindung verursacht (s. III, 3.8.1.). Die Schichten mit den Zellkörpern sind ungefärbt (Abb.3d). Zu keinem Zeitpunkt werden Zellkörper der retinalen Ganglienzellen angefärbt (Abb.3a-d).

Werden Explantatkulturen retinaler Axone nach Fixierung mit Formaldehyd durch den Antikörper gefärbt, dann erscheint das Axon gleichmäßig gefärbt, der Wachstumskegel dagegen zeigt eine schwächere Anfärbung (Abb.4). Ohne vorherige Fixierung lassen sich Axone nicht mit dem Antikörper anfärben. Durch die Fixierung mit Formaldehyd wird die Membran permeabilisiert und für die Antikörper durchlässig gemacht. Es ist daher anzunehmen, daß das Epitop, das vom Antikörper erkannt wird, intraaxonal lokalisiert ist. Das Antigen ist nicht in allen Axonen vorhanden.

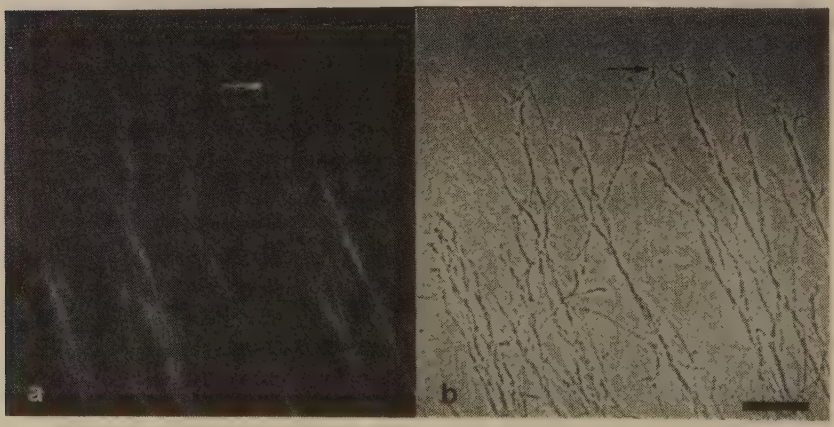


Abb.4: Färbung von in vitro kultivierten retinalen Axonen mit R1-Antikörper.
(a) Immunfluoreszenz, (b) Phasenkontrast.
Der Antikörper färbt Axone über ihre gesamte Länge gleichmäßig an, die Wachstumskegel (Pfeil) dagegen sind ungefärbt.
Maßstab: 50µm, Objektiv: 25x.

Die stärkere und ausgedehntere Anfärbung der temporalen optischen Faserschicht in den Entwicklungsstadien E5-E7 ist vermutlich durch den Entwicklungsvorsprung der temporalen Halbretina gegenüber der nasalen Halbretina bedingt; in späteren Entwicklungsstadien wird dieser Unterschied nicht mehr gefunden. Insgesamt erscheint die optische Faserschicht zu den verschiedenen Zeitpunkten gleich stark gefärbt. Daraus wird geschlossen, daß das Vorkommen des Antigens in Axonen vom Alter unabhängig ist. Die in vitro-Färbung von Axonen deutet darauf hin, daß das Antigen nur in einer Subpopulation von Axonen vorkommt.

3.1.2. Vorkommen des R1-Antigens in anderen Bereichen des Nervensystems

Im Stadium E9 werden im visuellen System mit dem R1-Antikörper außer der gesamten optischen Faserschicht in der Retina der optische Nerv, das Chiasma, der Trakt und das Stratum opticum auf dem Tectum gefärbt (Abb.5). Die retinalen Axone haben zu diesem Zeitpunkt das caudale Ende des Tectums noch nicht erreicht. Der Antikörper färbt außerdem weitere Fasertrakte zwischen den beiden Augen sowie im Bereich des Ziliarganglions (Abb.5). Im Tectum (E9) werden von dem Antikörper außer den Fasern der Retina (Stratum opticum) auch weitere, tiefer liegende Fasertrakte dargestellt (Abb.5). Auch im Tectum werden Zellkörper nicht markiert.

Die Färbung auf dem Tectum bleibt auch in späteren Entwicklungsstadien (E14) erhalten. Auch in anderen Bereichen des zentralen Nervensystems werden Fasertrakte durch den Antikörper gefärbt, z.B. im Diencephalon und Cerebellum. Im E17-Cerebellum färbt der R1-Antikörper die Molekularschicht und

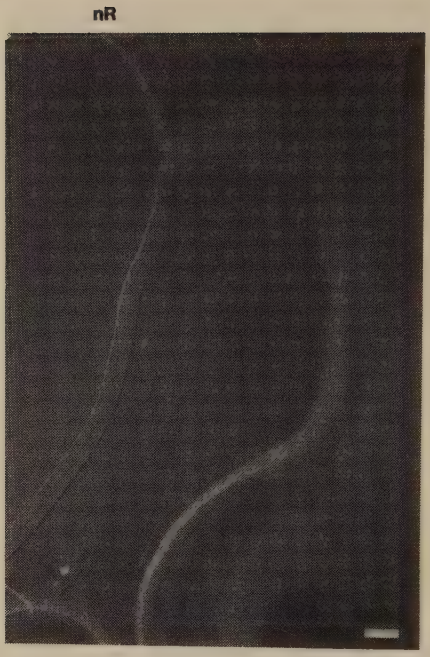


Abb.5: Darstellung des R1-Antigens auf einem E9-Ganzkopfschnitt.
Die Lage der Augen ist durch das schwarze Pigmentepithel erkennbar. Der Antikörper färbt die gesamte optische Faserschicht in der Retina. Der weitere Verlauf der retinalen Axone in der Fissur, dem Nerv und dem Chiasma sind ebenfalls angefärbt. Weitere Fasertrakte zwischen den Augen sind ebenfalls gefärbt.
Maßstab: 250µm, Objektiv: 2,5x.

die weiße Substanz (Abb.24a). Auf Schnitten im Rumpfbereich sind in der Immunfluoreszenz mit dem R1-Antikörper vor allem die weiße Substanz im Rückenmark und viele Fasertrakte im peripheren Bereich gefärbt (nicht gezeigt).

3.1.3. Speziesspezifität des Antigens

Der R1-Antikörper färbt in Schnitten von Maus-Retina spezifisch die optische Faserschicht (nicht gezeigt); Ganglienzellen und andere Faserschichten sind nicht sichtbar gefärbt. In der Goldfischretina färbt der R1-Antikörper die innere plexiforme Schicht (nicht gezeigt). Optische Faserschicht, Nerv und Tectum werden mit dem Antikörper in Fisch nicht gefärbt.

3.1.4. Charakterisierung des R1-Antigens im Proteinblot

Der Antikörper färbt in Immunoblots mit Tectumgewebe ein Protein sehr hohen Molekulargewichts mit Mr 300 kD (Abb.6). Das Antigen ist mit der Membranfraktion assoziiert (Abb.6).

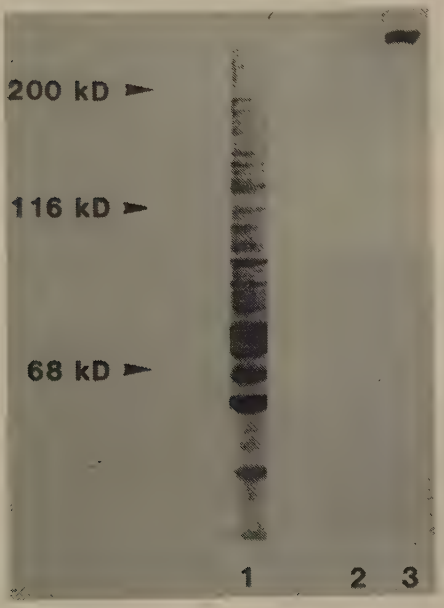


Abb.6: Identifizierung des R1-Antigens im Proteinblot.
E10-Tectum wurde in isotonischer Saccharose homogenisiert und durch Zentrifugation fraktioniert, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Fraktionen wurden solubilisiert und im Proteinblot untersucht. Es wurden 20ug Protein je Bahn aufgetragen.
(1) Gesamtproteindarstellung mit Amidoschwarz, (2) lösliche Fraktion, mit R1-Ak behandelt,
(3) Membranfraktion, mit R1-Ak behandelt. Links ist die Laufstrecke der zur Standardisierung verwendeten Proteine angegeben (Myosin 200kD, Galaktosidase 116kD, BSA 68kD und in anderen Abbildungen zusätzlich Ovalbumin 45kD). Das R1-Antigen ist fast ausschließlich in der Membranfraktion enthalten.

3.2. R2, ein Antigen, das in der Retina entwicklungsabhängig auftritt und in vielen weiteren Fasertrakten vorkommt

Die Hybridomzellinie entstammt der Fusion von Ag8-Myelomzellen mit Lymphozyten einer Maus, die mit optischem Trakt immunisiert worden war. Der Zellkulturüberstand reagierte nicht mit immobilisierten Glykopeptiden aus Hühnergehirn. Der Test des primären Zellkulturüberstandes in der Immunfluoreszenz zeigte, daß der Antikörper R2 die optische Faserschicht in Retinaschnitten färbt. Die Zellinie R2 produziert ein Immunglobulin der Klasse IgG3.

3.2.1. Lokalisierung und altersabhängige Verteilung des R2-Antigens im visuellen System

In antikörpergefärbten Kryostatschnitten von fixierter Retina erweist sich das Antigen ebenfalls als spezifisch für die axonalen Fortsätze retinaler Ganglienzellen, während

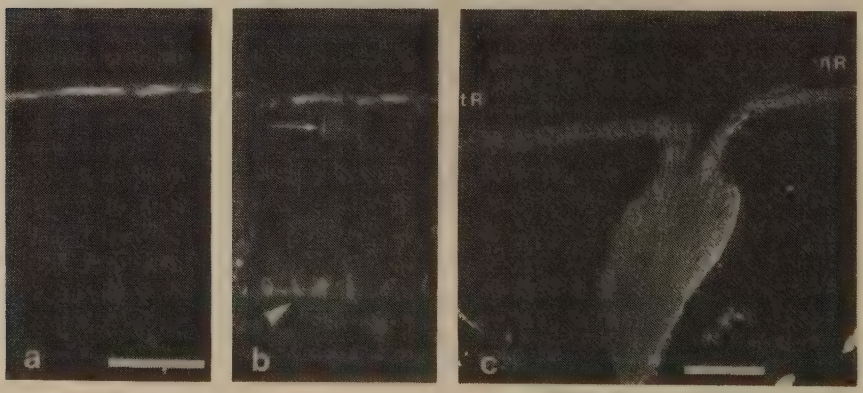


Abb.7: Indirekte Immunfluoreszenz mit R1- und R2-Antikörper auf Retinaschnitten (zentraler Bereich der Retina).
(a) R1-Ak auf E5-Retina, (b) R2-Ak auf E5-Retina, (c) R2-Ak auf E7-Retina. Der R2-Antikörper färbt in der E5-Retina vor allem die Axone in der optischen Faserschicht. Außerdem sind radiär verlaufende Fasern (Pfeil) und die Umrisse einzelner Zellen (Pfeilkopf) in dem Bereich gefärbt, in dem die Zellteilungen stattfinden. In der E7-Retina ist nur die optische Faserschicht gefärbt. Sie ist auf der temporalen Seite breiter als auf der nasalen Seite.
Maßstab: a,b) 50µm, c) 250µm; Objektive: a,b) 40x, c) 6,3x.

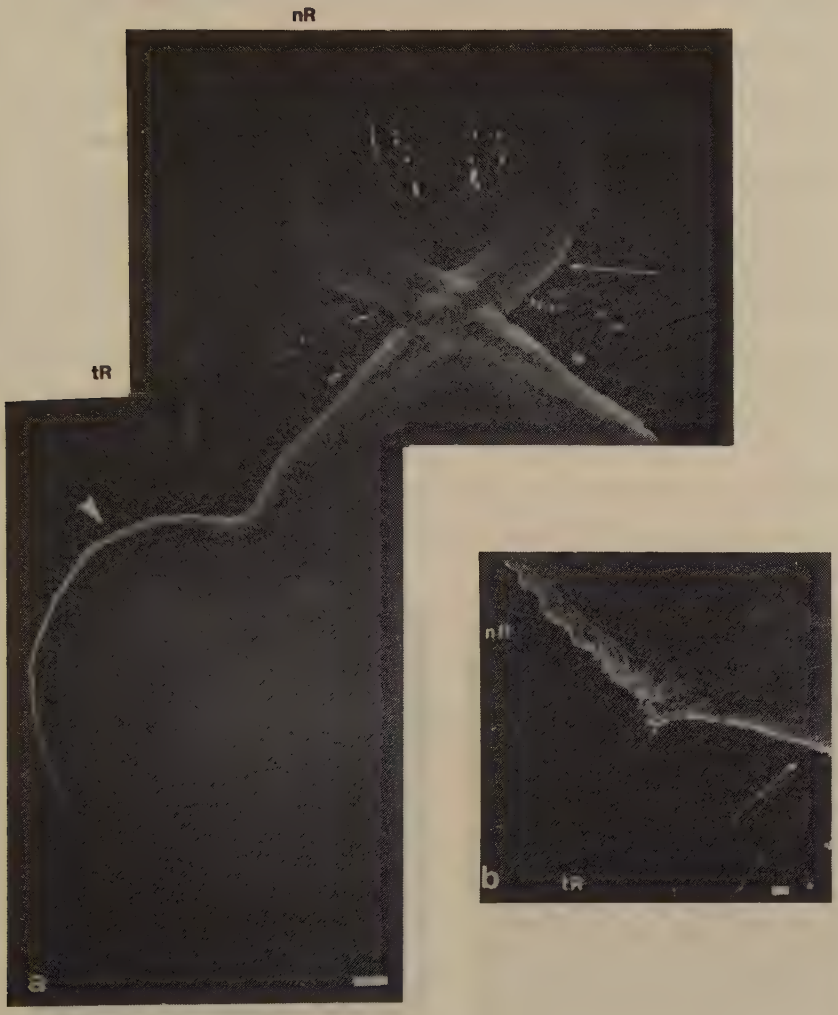


Abb.8: Anfärbung von E9-Ganzkopfschnitten mit R2-Antikörper.
(a) Augen, optischer Nerv, Trakt und Tectum, (b) Retinaausschnitt (Fissur). Der Antikörper färbt in dieser Schnittebene ausschließlich nasale Axone, temporale Axone sind unmarkiert. Im optischen Nerv ist vor allem der periphere Bereich gefärbt (Pfeil). Im Chiasma ist bei der Kreuzung der Faserbündel aus beiden Augen die Färbung peripherer Faserbündel gut sichtbar. Der Trakt und die oberste Schicht im Tectum, das Stratum opticum (Pfeilkopf), sind stark gefärbt. In tieferen Schichten des Tectums und zwischen den Augen sind weitere Fasertrakte gefärbt.
Maßstab: a) 250µm, b) 50µm, Objektive: a) 2,5x, b) 6,3x

Zellkörper das Antigen nicht meßbar enthalten. In frühen Differenzierungsstadien der Retina sind einzelne Axone in der optischen Faserschicht mikroskopisch, in der Abbildung jedoch nicht so gut erkennbar (E5, Abb.7b). Gefärbt sind außerdem radiär verlaufende, nicht identifizierte Fasern (Abb.7b, Pfeil) und einige Zellen in ihren Umrissen (Abb.7b, Pfeilkopf). In der Retina des Embryonaltages 7 ist der temporale Teil der optischen Faserschicht etwas breiter und stärker gefärbt als der nasale Teil (Abb.7c). Die Zellschichten in der E7-Retina sind nicht gefärbt.

Am Tag E9 färbt der Antikörper in Gefriermikrotomschnitten nur noch die Axone der nasalen Halbretina bis zur Fissur (Abb.8b). Der optische Nerv bis zum Chiasma ist vor allem in

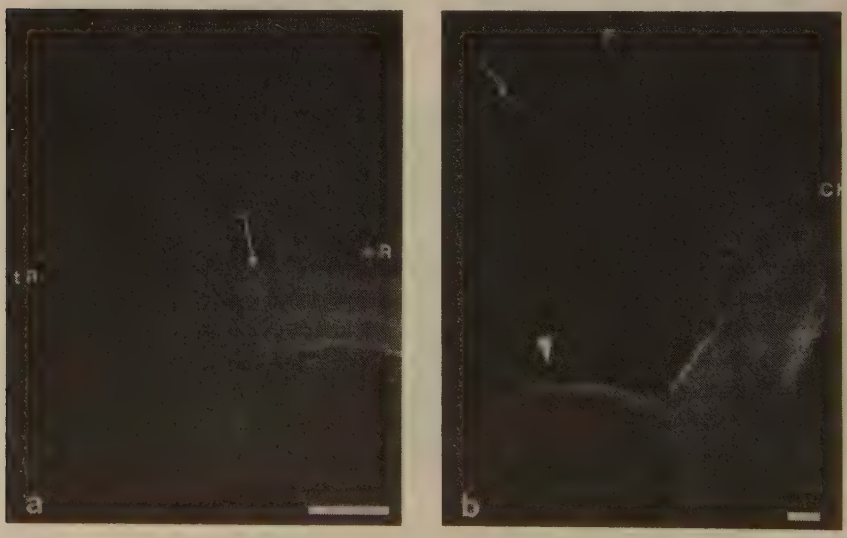


Abb.9: Anfärbung von E14-Ganzkopfschnitten mit R2-Antikörper.
(a) Retina (linkes Auge, zentraler Bereich), (b) linkes Auge, Trakt und Tectum. Die optische Faserschicht in der Retina (Pfeil) ist ungefärbt. Die Axone im Trakt und das Stratum opticum (Pfeilkopf) im Tectum sind gefärbt. Maßstab: 250µm, Objektive: a) 6,3x, b) 2,5x.

seinen Randbereichen gefärbt (Abb.8a). Gut sichtbar sind auch die lateralen Faserbündel beider Nerven bei der Kreuzung im Chiasma. Noch stärker gefärbt ist der optische Trakt, das Stratum opticum auf dem Tectum ist bis zu etwa 2/3 seiner rostrocaudalen Achse markiert (Abb.8a). Im Tectum sind außerdem noch weitere Fasertrakte in tieferen Schichten gefärbt.

Am Embryonaltag 14 ist in der Retina die optische Faserschicht überhaupt nicht mehr gefärbt (Abb.9a). Die Färbung der zwei Banden im Bereich der Photorezeptorschicht wird nicht durch die Bindung von Antikörpern, sondern wahrscheinlich durch Autofluoreszenz verursacht (s. III, 3.8.1., vgl. Abb.3d,16a,21a). Markiert durch Antikörper sind der optische Nerv ab dem Chiasma, der Trakt und das gesamte Stratum opticum auf dem Tectum (Abb.9b).

Um das Antigen in retinalen Explantaten in der indirekten Immunfluoreszenz darstellen zu können, müssen die Axone mit Formaldehyd fixiert werden; unfixierte Axone sind mit dem Antikörper nicht färbbar. Es ist daher wahrscheinlich, daß der Antikörper an ein intraaxonal lokalisiertes Epitop bindet.

Axone aus 2-4 Tage kultivierten Explantaten zeigen in der Anfärbung mit R2-Antikörper keine regiospezifischen Unterschiede, nasale und temporale Axone erscheinen gleich stark gefärbt. Betont wird vor allem der distale Bereich, während das Retinaexplantat und der daran angrenzende Bereich der Axone kaum gefärbt ist (Abb.10). Der Wachstumskegel des Axons läßt sich mit dem Antikörper nicht markieren. Andere Antikörper (z.B. R3-Ak) zeigen keine präferentielle Färbung des distalen Teils von Axonen. Es ist daher wahrscheinlich, daß die Färbung mit R2-Antikörper durch eine entsprechende Lokalisierung des Antigens bedingt ist und nicht durch versuchs-

bedingte Beschränkungen, wie die Zugänglichkeit des Antikörpers zu den Axonen im Kollagengel.

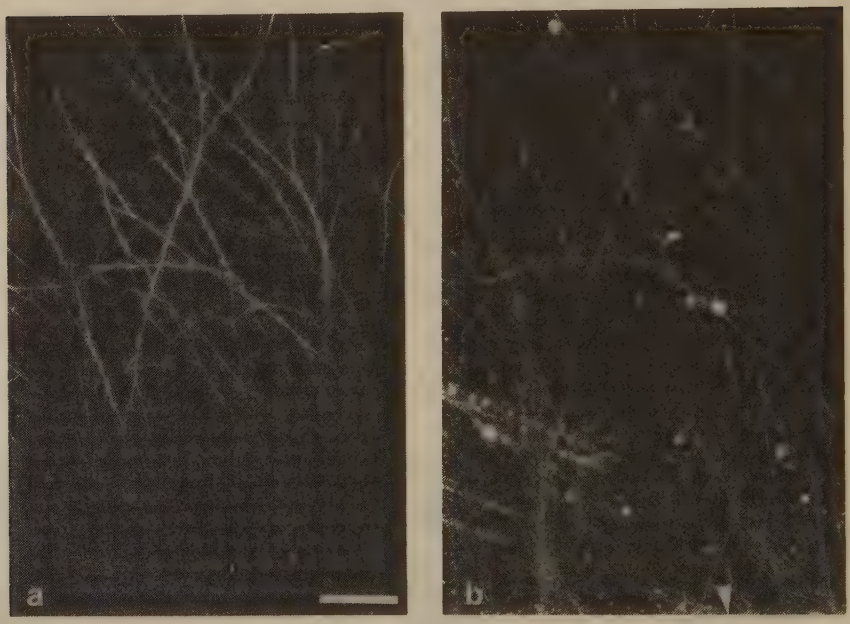


Abb.10: Färbung von in vitro kultivierten retinalen Axone mit R2-Antikörper.
(a) Immunfluoreszenz, (b) Dunkelfeld. Der Explantatstreifen, aus dem die Axone auswachsen, ist am unteren Bildrand (Pfeilkopf) sichtbar. Die Axone in der Nachbarschaft des Explantates sind nur vereinzelt gefärbt. In ihrem distalen Bereich sind die Axone stark gefärbt (Pfeil).
Maßstab: 250µm, Objektiv: 6,3x.

Das räumlich-zeitliche Auftreten des R2-Antigens läßt den Schluß zu, daß es sich nicht um ein positionsspezifisch exprimiertes, sondern um ein differenzierungsabhängig in retinalen Axonen vorkommendes Molekül handelt (s. V, 2., S. 59f.).

3.2.2. Vorkommen des R2-Antigens in anderen Bereichen des Nervensystems

Auf Ganzkopfschnitten (E9) färbt der Antikörper weitere Fasertrakte zwischen den Augen (Abb.8a). In Cerebellum-Schnitten (E17) werden nur in der weißen Substanz verlaufende Axone gefärbt. Die Molekularschicht ist ungefärbt (Abb.24b). In Ganzkörperschnitten (E9) reagiert der Antikörper mit der weißen Substanz des Rückenmarks und mit Fasern des peripheren Nervensystems (nicht gezeigt).

3.2.3. Speziesspezifität des R2-Antigens

In Retina, Nerv und Tectum eines adulten Goldfisches (6cm) findet man in Gefriermikrotomschnitten keine Anfärbung von Axonen. Nur im optischen Trakt sind einzelne Axone gefärbt. Die Färbung auf Mausretina ist negativ.

3.2.4. Charakterisierung des R2-Antigens im Proteinblot

In Proteinblots von solubilisiertem Tectumgewebe färbt der Antikörper ein Protein mit Mr 160kD. Es erscheint teilweise als Doppelbande (Abb.11a). Das R2-Antigen wird nach einer Zellfraktionierung in dem Membrankompartiment in größeren Mengen als in dem zytosolischen Kompartiment gefunden (Abb.11a). Die Behandlung solubilisierter Tectumproteine mit Perjodat beeinträchtigt die Anfärbung des R2-Antigens im Proteinblot nicht. Das R2-Antigen hat in der deglykolysierten Proteinfraktion dasselbe Molekulargewicht wie in der unbehandelten Probe (Abb.11b). Es ist daher anzunehmen, daß der Antikörper an ein intraaxonal lokalisiertes Protein ohne Kohlehydratanteil bindet.

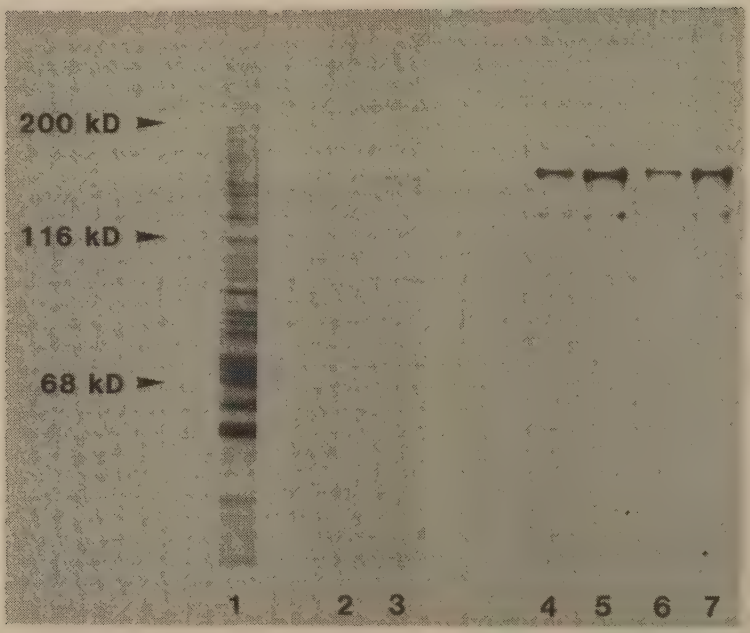


Abb.11: Nachweis des R2-Antigens im Proteinblot.
(a) Kompartimentierung des Antigens. Die Gewinnung subzellulärer Tectumfraktionen erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Die Fraktionen wurden solubilisiert und im Proteinblot (20µg Protein je Bahn) untersucht. (1) Gesamtproteindarstellung mit Amidoschwarz, (2) Lösliche Fraktion, (3) Membranfraktion, (2) und (3) sind mit R2-Antikörper behandelt. Das R2-Antigen ist in der Membranfraktion in größeren Mengen als in der löslichen Fraktion vorhanden.
(b) Behandlung solubilisierter Tectumproteine mit Perjodat. (4),(5) Kontrolle, 5 bzw. 20µg Protein; (6),(7) Behandlung mit Perjodat, 5 bzw. 20µg Protein. Die mit Perjodat behandelten Proben sind im Proteinblot mit R2-Antikörper etwas schwächer gefärbt, haben aber dasselbe Molekulargewicht wie unbehandelte Proben. Die Markerproteine entsprechen den in Abb.6 verwendeten.

3.3. R3, ein Antigen, das mit hoher Spezifität und altersabhängig in retinalen Axonen vorkommt

Der Antikörper, der sich von dem Hybridomaklon R3 ableitet, ging aus einer Fusion von Ag8-Myelomzellen mit Lymphozyten einer Maus, die mit Glykopeptiden immunisiert worden war, hervor. Der primäre Zellkulturüberstand reagierte im ELISA mit immobilisierten Glykopeptiden. Im darauffolgenden zweiten Selektionsschritt in der indirekten Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten von E7-Hühnchenköpfen zeigt der Antikörper eine Spezifität für die optische Faserschicht in der Retina. Der Klon R3 produziert ein Immunglobulin der Klasse IgG3.

3.3.1. Lokalisierung und altersabhängige Verteilung des R3-Antigens im visuellen System

Der R3-Antikörper färbt ab frühen Stadien der Retinaentwicklung spezifisch nur die Axone der Ganglienzellen.

Abb.12: Anfärbung eines E7-Ganzkopfschnittes mit R3-Antikörper.
Gefärbt ist die optische Faserschicht in der Retina, der Nerv und das Chiasma. Der Trakt verläuft etwas oberhalb der Schnittebene. Deshalb ist dieser Bereich ungefärbt. Gut sichtbar sind die retinalen Axone auf dem rostralen Tectum (Pfeil).
Maßstab: 250µm, Objektiv: 2,5x.

Am Embryonaltag 7 werden temporale und nasale optische Faserschicht gleichermaßen gefärbt (Abb.12,13a), die temporale Halbretina ist etwas weiter entwickelt (nicht sichtbar). Die Färbung erstreckt sich auf den weiteren Verlauf der Axone im optischen Nerv, Chiasma, Trakt und der Faserfront der retinalen Axone auf dem rostralen Teil des Tectums (Abb.12, 13b).

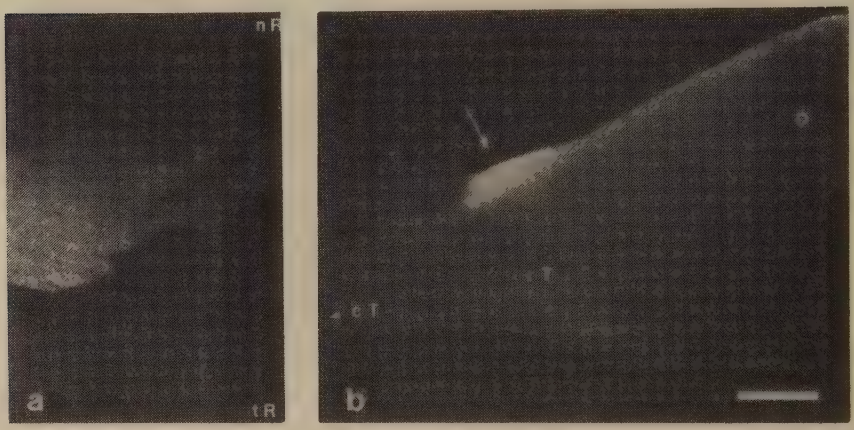


Abb.13: Indirekte Immunfluoreszenz mit R3-Antikörper auf E7-Retina und -Tectum.
(a) Retina, (b) Tectum (rostrale Region). Temporale und nasale optische Faserschicht in der Retina sind gefärbt, die temporale Seite ist etwas weiter entwickelt. Die Faserfront der retinalen Axone auf dem rostralen Tectum ist als ovaler Bereich (Pfeil) sichtbar. Einzelne Axone sind nicht zu erkennen. Bezeichnungen: rT = rostrales Tectum, cT = caudales Tectum, D = Diencephalon. Maßstab: 250µm, Objektiv: 6,3x.

In Gefriermikrotomschnitten des Embryonalstadiums E9 in derselben Ebene werden mit R3-Antikörper nur Axone in der nasalen Halbretina gefärbt, während die Axone auf der temporalen Seite schwach gefärbt erscheinen (Abb.14, Abb.15a).

Beim Eintritt der Axone in den optischen Nerv an der Fissur wachsen die nasalen Axone zunächst auf die laterale Seite des optischen Nervs (Abb.14,15a). Daraus läßt sich schließen, daß sich die Axone aus nasaler und temporaler Retina beim Eintritt in den Nerv kreuzen (vgl. Abb.8). Diese

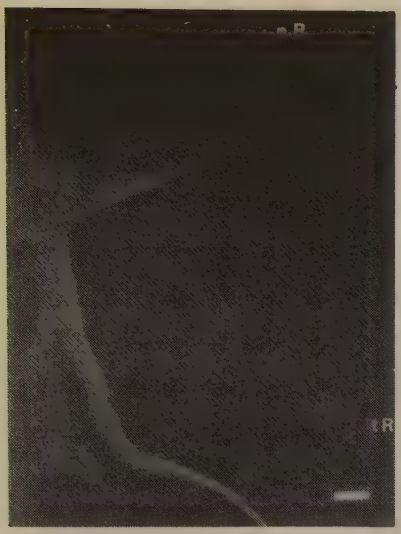
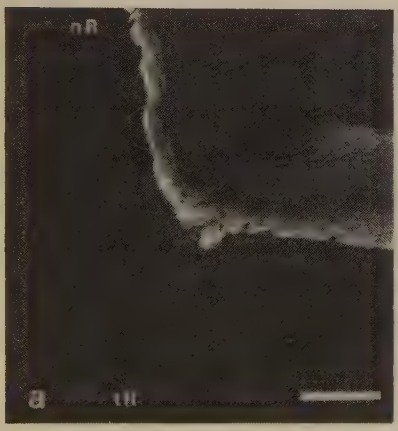


Abb.14: Anfärbung eines E9-Ganzkopfschnittes mit R3-Antikörper.
Die nasale optische Faserschicht ist stark gefärbt, die temporale Seite der Faserschicht ist vollständig ungefärbt. Die Färbung retinaler Axone erstreckt sich weiter auf den Nerv, das Chiasma, den Trakt und das Stratum opticum auf dem Tectum. Fasertrakte zwischen den Augen und in tieferen Schichten des Tectums sind nicht gefärbt (vgl. Abb.8).
Maßstab: 250um, Objektiv: 2,5x.



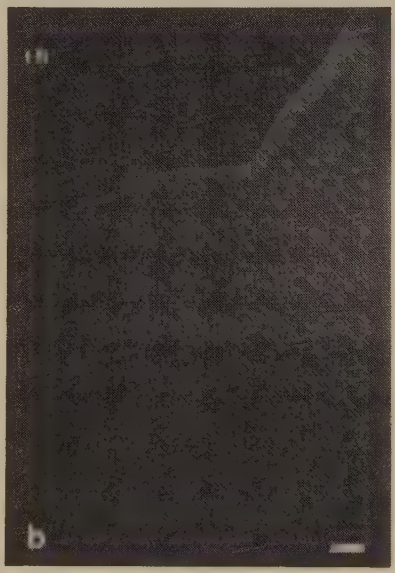


Abb.15: Anfärbung von E9-Retina und -Tectum mit R3-Antikörper.
(a) Retina. In der Ebene der Fissur sind nur die Axone der nasalen Retina gefärbt. An ihrem Eintritt in den Nerv sieht man, daß die Axone der nasalen Retina zunächst auf die laterale Seite des optischen Nervs wachsen. Diese Ordnung geht im weiteren Verlauf des Nervs verloren, und der Nerv ist einheitlich gefärbt.
(b) linkes Tectum. Gefärbt ist ausschließlich das Stratum opticum. Andere Fasertrakte werden nicht markiert (vgl. Abb.8b). Oben links ist ein Teil der temporalen Retina (begrenzt durch das dunkle Pigmentepithel) zu sehen. Die optische Faserschicht ist nicht gefärbt.
Maßstab: 250µm, Objektive: a) 6,3x, b) 2,5x.

nasotemporale Vorordnung geht jedoch im Nerv rasch verloren (Abb.15a). Auf dem Tectum selbst haben die retinalen Axone zu diesem Zeitpunkt etwa die Hälfte der rostrocaudalen Achse im Stratum opticum zurückgelegt (Abb.15b).

Weitere Fasertrakte im Tectum, die mit anderen, axonspezifischen Antikörpern markiert werden (Abb.8b), sind in der Immunfluoreszenz mit R3-Antikörper negativ (Abb.13b, 15b). Die symmetrisch zur Fissur auftretende Verteilung des R3-Antigens im Stadium E7 (Abb.12) wird bis E9 asymmetrisch (Abb.14). Die Intensitätsänderung der Färbung auf der temporalen Seite zwischen E7 und E9 betrifft alle temporalen Axone. Auch mit stärkerer Vergrößerung zeigen sich in der temporalen optischen Faserschicht keine einzelnen, stark gefärbten Axone. Rekonstruiert man die Anfärbung der optischen Faserschicht im E9-Auge in Serienschnitten, so ergibt sich eine nasotemporale Grenze entlang der Fissur, die die Retina in 2 Territorien aufteilt (Abb.23). Im dorsalen Teil der Retina verläuft die Grenze zwischen gefärbtem und ungefärbtem Bereich nicht in direkter Verlängerung der Fissur, sondern in einem mehr temporal gelegenen Bereich (Abb.23). Die Grenze zwischen markierten und unmarkierten Fasern ist auch unschärfer als im Bereich der Fissur, die Färbung nimmt graduell zur Peripherie hin ab (Abb.23). Diese Verteilung des R3-Antigens findet sich auch noch im Stadium E11. In der E14-Retina ist das R3-Antigen in der Immunfluoreszenz nicht mehr nachzuweisen (Abb.16a). Stark gefärbt sind zu diesem Zeitpunkt noch der Trakt und das Stratum opticum auf dem Tectum (Abb.16b).

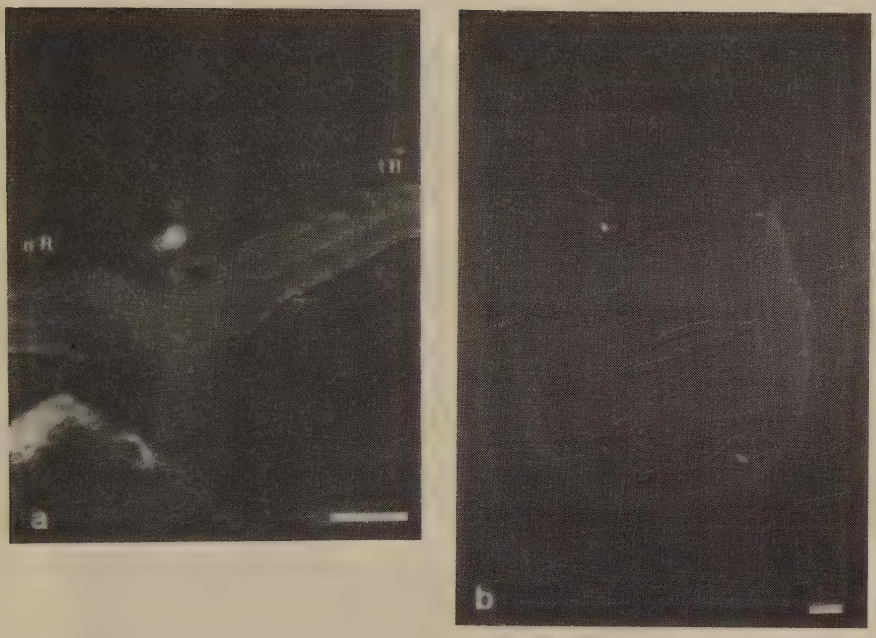


Abb.16: Immunfluoreszenzfärbung mit R3-Antikörper auf E14-Ganzkopfschnitten.
(a) Retina (Fissur). Die optische Faserschicht in der Retina ist ungefärbt.
Maßstab: 250µm, Objektiv: 6,3x.
(b) Tectum. Auf dem Tectum ist das gesamte Stratum opticum gefärbt.
Maßstab: 250µm, Objektiv: 2,5x.

Unfixierte Axone von in vitro kultivierten Retinaexplantaten, die mit R3-Antikörper gefärbt werden, sind nur schwach markiert. Das deutet darauf hin, daß das Antigen intrazellulär lokalisiert ist und für den Antikörper erst durch Fixierung zugänglich gemacht wird. Nach Fixierung lassen sich Axone und ihre Wachstumskegel mit dem R3-Antikörper färben. Auf Axonen von fixierten Retinaexplantaten, die im Stadium E6 angelegt und 4 Tage in vitro gewachsen sind, läßt sich die unterschiedliche Färbung von nasalen und temporalen Axonen nicht zeigen. Einzelne Axone oder Bündel von Axonen zeigen auch nur geringe Unterschiede in der Anfärbung mit R3-Antikörper zwischen pro-

ximalem und distalem Teil des Axons. Eine ausgebreitete Retina des Stadiums E9, die mit R3-Antikörper gefärbt ist, zeigt nasotemporale Intensitätsunterschiede der Färbung ebenfalls sehr viel schwächer als Gefrierschnitte.

Die Entwicklung der räumlichen Expression des R3-Antigens macht es wahrscheinlich, daß es sich ebenfalls um ein altersabhängig in Axonen vorkommendes Molekül handelt. Da es auf in vitro gewachsenen und mit R3-Antikörper gefärbten Axonen keine präferentiell gefärbten Bereiche gibt, bleibt ungeklärt, wieso das R3-Antigen in der E14-Retina nicht mehr gefunden wird.

3.3.2. Vorkommen des R3-Antigens in anderen Bereichen des Nervensystems

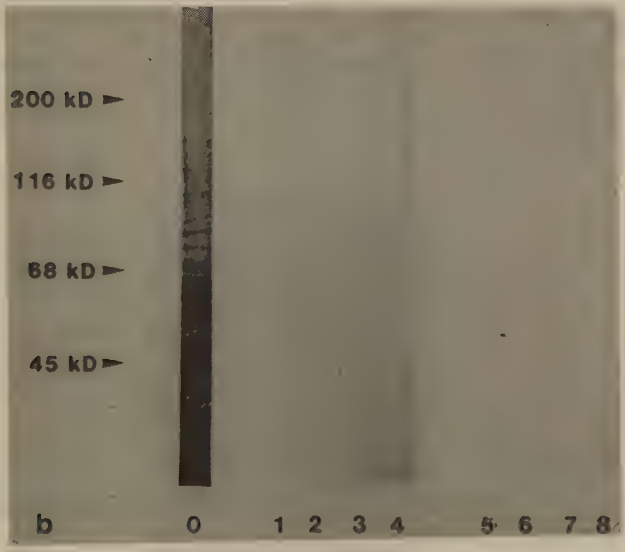
Auf Ganzkopfschnitten (E7,E9) lassen sich mit dem Antikörper andere Fasertrakte als die zum visuellen System gehörenden nicht darstellen (Abb.12,15; vgl.Abb.9a). Im Cerebellum (E17) färbt der Antikörper im Bereich der Molekularschicht ein Band mit geringer Intensität außen und ein angrenzendes Band innen mit hoher Intensität (Abb.24c). Auch Axone im Rückenmark und im peripheren Nervensystem lassen sich mit dem Antikörper anfärben.

3.3.3. Speziesspezifität des R3-Antigens

Der Antikörper zeigt in der Immunfluoreszenz keine Kreuzreaktion mit retinalem oder tectalem Gewebe aus Goldfisch.

Auf Schnitten von Mausretina findet man eine schwache Anfärbung der optischen Faserschicht.

Abb.17: Proteinblot mit R3-Antikörper.
(a) Behandlung solubilisierter Tectumproteine mit Perjodat.
(3) Kontrolle, (2) perjodatbehandelte Probe; je 20µg Protein, Anfärbung mit R3-Ak; (1) Gesamtproteindarstellung.
In der Kontrolle färbt der R3-Antikörper ein Protein mit Mr 48kDa. Die Behandlung solubilisierter Proteine aus Tectum mit Perjodat führt zu einer Verschiebung dieser Bande von Mr 48kDa zu Mr 41kDa. Mit hohen Proteinmengen wird eine weitere Bande bei Mr 43kDa, vermutlich Aktin, angefärbt, deren Lage und Anfärbung durch die Perjodatbehandlung nicht beeinflußt wird. Eine weitere Bande findet man in der unbehandelten Probe am Anfang des Trenngels, nach der Behandlung der solubilisierten Proteine mit Perjodat findet man weitere Banden bei Mr 300kDa und 80kDa.



(b) Differentielle Expression von R3-Antigen auf nasaler und temporaler Halbretina.

Retinae wurden ohne Fissur in zwei Hälften geteilt und in Probenpuffer solubilisiert. In (1-4) ist E7-Retina, in (5-8) E10-Retina untersucht. Auf Bahn 1,2,5 und 6 wurde nasale Halbretina, in Bahn 3,4,7 und 8 temporale Halbretina in jeweils zwei Konzentrationen aufgetrennt. In der E7-Retina ist das R3-Antigen in nasaler und temporaler Retina in ähnlichen Mengen vorhanden. Im Entwicklungsstadium E9 ist das R3-Antigen in der temporalen Retina nur noch bei hohen Gesamtproteinmengen nachzuweisen (Bahn 7), mit niedrigen Proteinmengen jedoch nicht mehr zu finden (Bahn 8). Eine Gesamtproteindarstellung mit Amidoschwarz ist in Bahn 0 gezeigt, die Markerproteine entsprechen den in Abb.5 verwendeten.

3.3.4. Charakterisierung des R3-Antigens im Proteinblot

Proteinblots von solubilisiertem Tectumgewebe zeigen mit R3-Antikörper eine Bande bei Mr 48 kDa und eine Bande bei Mr 43kDa (Abb.17a). Werden solubilisierte Tectumproteine mit Perjodat behandelt, um Glykosylseitenketten abzubauen, bleibt die Bande bei Mr 43kDa erhalten, die Bande mit Mr 48kDa wird zu einem Molekül mit 41kDa umgewandelt (Abb.17a). Die Intensität der Anfärbung sämtlicher Banden wird nicht von der Behandlung mit Perjodat beeinflußt. Das Protein mit Mr 48kDa findet sich auch in verschiedenen Mengen in nasaler und temporaler E10-Retina, so daß die Anfärbung dieser Bande spezifisch erscheint. Das bedeutet, daß der Antikörper das Proteinepitop eines Glykoproteins erkennt.

Die differentielle Expression des R3-Antigens auf retinalen Fasern zeigt sich auch im Proteinblot, wenn für die Solubilisierung der Proteine getrennte Retinahälften ohne die optische Fissur präpariert werden (Abb.17b). In E7-Retina enthalten nasale und temporale Hälfte etwa die gleiche Menge an R3-Antigen, im Stadium E9 enthält die nasale Halbretina deutlich mehr Antigen als die temporale Hälfte. Werden geringe Proteinmengen für den Immunblot verwendet, läßt sich das Antigen nur noch in der nasalen Retina nachweisen (Abb.17b).

3.4. R4, ein entwicklungsabhängiges Antigen, das mit Vesikeln im Axon assoziiert ist

Die Hybridomzellinie R4 entstammt der Fusion von Ag8-Myelomzellen mit Lymphozyten einer Maus, die mit Homogenat von optischem Trakt immunisiert worden war. Der Zellkulturüberstand war im Immunassay negativ, färbte aber spezifisch die

optische Faserschicht von E7-Retina. Der Antikörper gehört der Immunglobulinklasse IgM an.

3.4.1. Lokalisierung und altersabhängige Verteilung des R4-Antigens im visuellen System

Frühe Axone in der Retina (E5) werden durch den R4-Antikörper nur sehr schwach gefärbt, deutlich gefärbt dagegen sind die Axone im optischen Nerv von E5-Huhn. In der E7-Retina ist die temporale optische Faserschicht der Retina im Bereich der Fissur stärker gefärbt und bis in periphere Bereiche sichtbar, während die nasale optische Faserschicht schwächer und nur in einem kleinen Bereich angefärbt ist (Abb.18; vgl. R1-Ak auf benachbarten Schnitten, Abb.2b). In der optischen Faserschicht sind die Axonbündel nicht einheitlich gefärbt, sondern man sieht eine körnige Anfärbung der optischen Faserschicht (vgl. R2-Ak auf benachbarten Schnitten, Abb.7).

Abb.18: Färbung mit R4-Antikörper auf E7-Retina.
Es wird nur die optische Faserschicht markiert, die Zellschichten sind ungefärbt. Die temporale optische Faserschicht ist stärker gefärbt als die nasale (vgl. Abb.2c). Einzelne Axone sind nicht erkennbar.
Maßstab: 250um, Objektiv: 6,3x.

Auf Schnitten von E9-Retina ist präferentiell die nasale optische Faserschicht gefärbt, die temporale Seite ist nur relativ schwach gefärbt (Abb.19), die Zellkörper der Ganglienzellen sind nicht markiert.

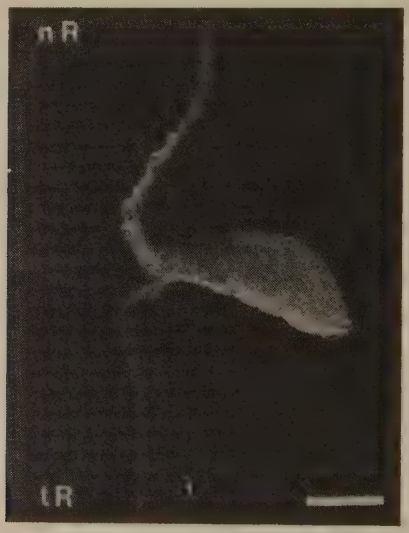


Abb.19: Färbung mit R4-Antikörper auf E9-Retina.
Es wird nur die optische Faserschicht gefärbt, die Ganglienzellschicht und die innere plexiforme Schicht sind nicht markiert. Die nasale optische Faserschicht ist wesentlich stärker gefärbt als die temporale.
Maßstab: 250µm, Objektiv: 6,3x.

Die Färbung nasaler Axone kann bis in periphere Bereiche beobachtet werden (nicht gezeigt), während die temporalen Axone nur in der Nähe der Fissur gefärbt sind (Abb.20). In Färbungen von Ganzkopfschnitten (E9) ist erkennbar, daß der Antikörper den optischen Nerv, das Chiasma, den Trakt und das Stratum opticum im Tectum anfärbt (Abb.20).

Die Färbung mit R4-Antikörper auf Retinaschnitten (E5-E9) ist etwas schwächer als die mit den anderen Antikörpern (R1, R2) in diesem Zeitraum beobachtete Färbung der optischen

Abb.20: Immunfluoreszenzfärbung eines E9-Ganzkopfschnittes mit R4-Antikörper.
Gefärbt sind die Axone der retinalen Ganglienzellen im Auge, Nerv, Chiasma, Trakt und dem Stratum opticum im Tectum. Die nasale optische Faserschicht in der Retina ist präferentiell gefärbt. Weitere Fasertrakte im Tectum sind ebenfalls gefärbt.
Maßstab: 1mm, Objektiv: 6,3x.

Faserschicht. In späteren Stadien (E14) ist die optische Faserschicht in der zentralen Retina schwach gefärbt (Abb.21). Die Färbung der äußeren plexiformen Schicht und der Photorezeptorschicht ist keine spezifische FITC-Fluoreszenz (vgl. III, 3.8.1.). Zellkörper in der Retina sind zu keinem Zeitpunkt gefärbt.

In Explantatkulturen retinaler Axone läßt sich das R4-Antigen erst nach Fixierung nachweisen. Man findet eine nicht homogen in Axonen auftretende, gepunktete Färbung von ca. 30 % der Axone. Die Anfärbung ist auf den distalen Bereich des

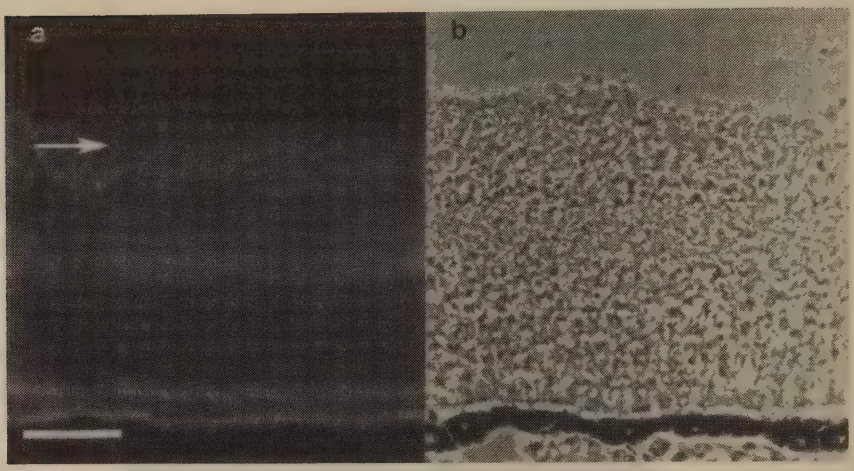


Abb.21: Färbung mit R4-Antikörper auf E14-Retina.
(a) Immunfluoreszenz, (b) Phasenkontrast. Die optische Faserschicht in der Retina ist schwach gefärbt (Pfeil). Die Färbung in der äußeren plexiformen Schicht und der Photorezeptorschicht ist nicht durch Antikörper verursacht (s. III,3.8.1.).
Maßstab: 50µm, Objektiv: 40x.

Axons und den Wachstumskegel konzentriert, der proximale Teil des Axons erscheint schwächer gefärbt.

Das Auftreten von R4-Antigen in retinalen Axonen weist räumliche und zeitliche Korrelation mit der Bildung von Ganglienzellen auf. Der Schwerpunkt der Zellproliferation verlagert sich zwischen E6 und E8 von der temporalen auf die nasale Seite der Retina. Es ist daher anzunehmen, daß es sich beim R4-Antigen wie beim R2- und beim R3-Antigen um ein entwicklungsabhängig reguliertes Molekül handelt. Die inhomogene Färbung mit R4-Antikörper von Axonen auf Gefriermikrotomschnitten und in Zellkultur lassen vermuten, daß das R4-Antigen ein intraaxonal lokalisiertes, am axonalen Transport beteiligtes Molekül ist.

3.4.2. Verteilung des R4-Antigens in anderen Bereichen des Nervensystems

Neben den Fasertrakten des visuellen Systems färbt der R4-Antikörper weitere Fasertrakte zwischen den Augen und in tieferen Schichten des Tectums (Abb.20). Auf Cerebellumschnitten (E17) färbt der Antikörper die Molekularschicht mit hoher Intensität, die anderen Schichten erscheinen schwach gefärbt (Abb.24d). Die weiße Substanz im Rückenmark und periphere Fasern lassen sich ebenfalls mit dem Antikörper darstellen (nicht gezeigt). Die Färbungen dieser Gewebe erscheinen ebenfalls inhomogen.

3.4.3. Speziesspezifität des R4-Antigens

Der Antikörper zeigt in der Immunfluoreszenz keine Kreuzreaktion mit neuronalem Gewebe aus Goldfisch, die Färbung auf Mausretina zeigt eine schwache Anfärbung der Ganglienzellschicht und der optischen Faserschicht (nicht gezeigt).

3.4.4. Charakterisierung des R4-Antigens im Proteinblot

Der R4-Antikörper färbt im Proteinblot mit solubilisiertem Tectumgewebe (E10) eine Bande bei Mr 48 kDa (Abb.22). Wird ein E10-Tectum in isotonischer Sucrose homogenisiert und durch differentielle Zentrifugation fraktioniert, findet sich das R4-Antigen in der Membranfraktion und in geringerer Menge in der löslichen Fraktion (Abb.22).

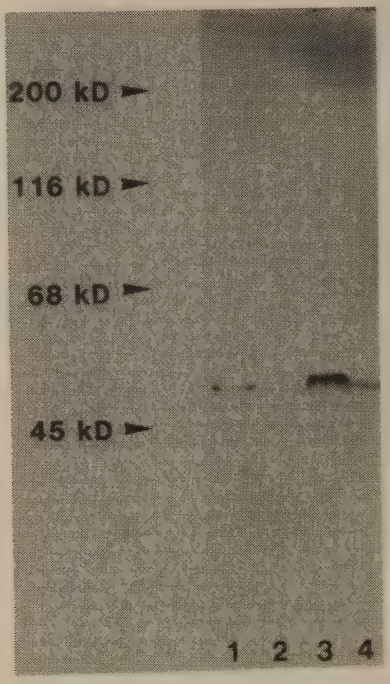


Abb.22: Proteinblot mit R4-Antikörper auf subzellulären Fraktionen von tectalem Gewebe. E10-Tectum wurde in isotonischer Saccharose homogenisiert und fraktioniert, wie beschrieben. (1,2) Lösliche Fraktion; (3,4) Membranfraktion in jeweils zwei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (0,25 bzw. 1mg/ml). Das R4-Antigen ist in der Membranfraktion und der löslichen Fraktion vorhanden, in der Membranfraktion ist es in größerer Menge enthalten.

4. Vergleich der R1-, R2-, R3- und R4-Antigene

Die Intensität der Färbungen von Retinae verschiedenen Alters mit den R-Antikörpern in den Abbildungen des Kapitels IV, 3. sind nicht alle direkt vergleichbar, da die Aufnahmen teilweise zu verschiedenen Zeiten und mit unterschiedlichen Antikörperchargen entstanden sind. Vergleichbar sind die Fluoreszenzintensitäten aber in der Regel auf den Schnitten eines Alters, da es sich um Nachbarschnitte handelt, die zum selben Zeitpunkt angefärbt und photographiert worden sind. Eine Abschätzung der Fluoreszenzintensität der Färbungen mit den R-Antikörpern ergibt die Reihenfolge: R1 = R2 > R4 > R3.

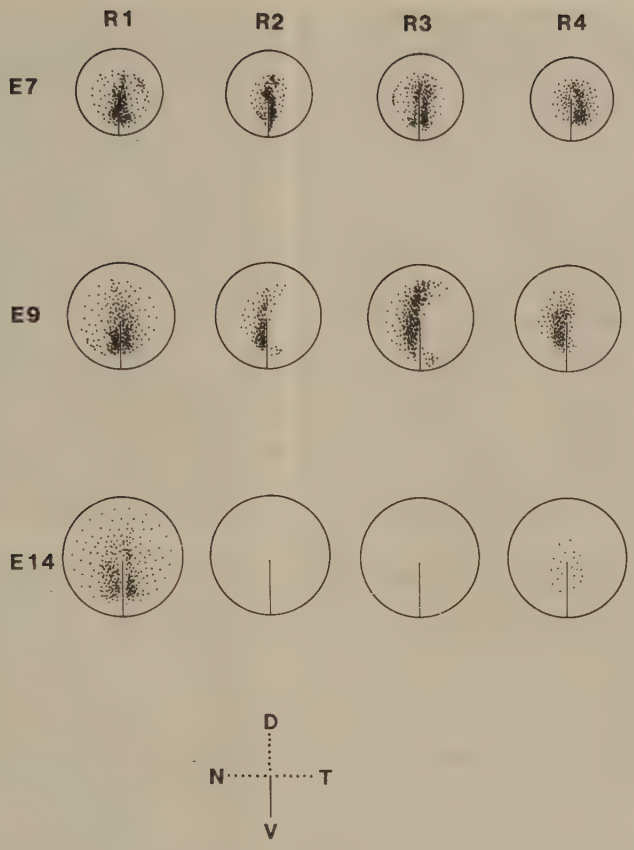


Abb.23: Schematische Darstellung der mit den Antikörpern R1-R4 gefärbten Bereiche der optischen Faserschicht der Retina im Verlauf der Entwicklung.
Serienschnitte durch Augen der Stadien E7, E9 und E14 im Abstand von 1mm wurden mit den R-Antikörpern gefärbt. Auf diesen Schnitten wurden die Färbungsintensität und die gefärbten Bereiche visuell abgeschätzt. Die Ausdehnung des gefärbten Bereiches ist durch Punkte und die Intensität der Färbung durch die Dichte der Punkte angegeben. Die topographische Verteilung des R1-Antigens in den Axonen der Retina ist in der untersuchten Zeit konstant. In der E7-Retina sind das R2- und das R3-Antigen in nasaler und temporaler optischer Faserschicht zu finden. Diese beiden Antigene sind in der E9-Retina in der temporalen optischen Faserschicht kaum mehr nachweisbar. Im Bereich der Fissur ist diese Entwicklung am weitesten fortgeschritten. In der E14-Retina sind das R2- und R3-Antigen auch in der nasalen optischen Faserschicht nicht mehr zu finden. Das R4-Antigen ist in der E7-Retina präferentiell auf der temporalen optischen Faserschicht, in der E9-Retina stärker auf der nasalen optischen Faserschicht zu finden. In E14-Retina findet man das R4-Antigen in allen Bereichen in geringer Menge.

Um das zeitabhängige Auftreten der R-Antigene in retinalen Axonen zu untersuchen, wurden horizontale Serienschnitte der Retina mit den R-Antikörpern gefärbt. Die Färbung der optischen Faserschicht in den Entwicklungsstadien E7, E9 und E14 ist in Abb.23 schematisch dargestellt.

Am Tag 7 sind die mit dem R1-, R2- und R3-Antikörper gefärbten Bereiche sehr ähnlich, das R2-Antigen ist jedoch auf die zentrale Region der Retina beschränkt. Das R4-Antigen ist stark in der temporalen Halbretina vertreten. Dort ist im Gegensatz zur nasalen Seite die periphere Faserschicht noch gefärbt. In Horizontalschnitten im Bereich der Fissur ist die temporale Retina stärker gefärbt als die nasale Retina.

Am Tag E9 entspricht die räumliche Verteilung des R1-Antigens der in der E7-Retina. Die räumliche Verteilung der anderen Moleküle ist im Stadium E9 stark verändert. Das R2-Antigen ist weiterhin in der zentralen Region der Retina lokalisiert, kommt aber im Bereich der Fissur nur noch auf nasalen Axonen vor. In dem dorsal der Fissur gelegenen Bereich reicht die färbbare Region etwas in die temporale Hälfte hinein. Sehr ähnlich entwickelt sich bis E9 die Verteilung des R3-Antigens. Es ist aber auch, im Gegensatz zu dem R2-Antigen, noch in ganz peripheren nasalen Bereichen zu finden. Im ventralen Bereich sind die R2- und R3-Antigene schwach in der temporalen optischen Faserschicht zu finden. Das R4-Antigen ist in der E9-Retina stärker in der nasalen als in der temporalen optischen Faserschicht vertreten. Im ventralen Bereich fehlt es auf der temporalen Halbretina fast vollständig.

In der E14-Retina ist das R1-Antigen noch in der gesamten optischen Faserschicht vorhanden, während die R2- und R3-Antigene überhaupt nicht mehr in der Retina zu finden sind. Das

Abb.24: Färbung von R1-R4-Antikörper auf E17-Cerebellum.
(a) R1-Ak, (b) R2-Ak, (c) R3-Ak, (d) R4-Ak. R1-Antikörper färbt in Molekularschicht und weißer Substanz, R3-Antikörper nur in der Molekularschicht mit 2 Bändern unterschiedlicher Intensität. R2-Antikörper färbt ausschließlich im Bereich der weißen Substanz. R4-Antikörper färbt externe Körnerschicht und Molekularschicht in gleicher Intensität. Bezeichnungen: AKS = äußere Körnerschicht, MS = Molekularschicht, PS = Purkinjezellschicht, IKS = innere Körnerschicht, WS = weiße Substanz.
Maßstab: 250µm, Objektiv: 6,3x.

R4-Antigen ist noch schwach in allen Regionen der E14-Retina vorhanden.

Der Vergleich der R-Antigene im Proteinblot zeigt, daß R3- und R4-Antigen dasselbe Molekulargewicht haben. R1- und R2-Antigen sind Proteine unterschiedlichen, von R3/R4-Antigen verschiedenen, Molekulargewichts (Abb.6,11,17,22). R3- und R4-Antigen sind trotz identischen Molekulargewichts im Proteinblot unterschiedliche Proteine, da sich ihr histologisches Vorkommen stark unterscheidet.

Die Färbung von Cerebellumschnitten (E17) zeigt, daß die in der Retina sehr ähnlich auftretenden R2- und R3-Antigene im Cerebellum in verschiedenen Bereichen lokalisiert sind (Abb.24). Das R2-Antigen kommt ausschließlich auf Fasertrakten in der weißen Substanz vor, das R3-Antigen hauptsächlich in der Molekularschicht und in geringen Mengen in der externen Körnerzellschicht. Das R1-Antigen kommt in der Molekularschicht und in der weißen Substanz vor, das R4-Antigen in der Molekularschicht und der äußeren Körnerschicht.

V. DISKUSSION

Das Ergebnis dieser Arbeit ist die Identifikation von Molekülen, die vorzugsweise im distalen Bereich der Axone retinaler Ganglienzellen vorkommen. Es wurden die monoklonalen Antikörper R1-R4 gefunden, die verschiedene, nahezu ausschließlich in Axonen vorkommende Proteine erkennen. Das Auftreten der R2-, R3- und R4-Antigene in retinalen Axonen ist entwicklungsabhängig reguliert und zeigt in der Retina eine ausgeprägte räumliche Ordnung, das R2-Antigen ist in den jüngsten Teilen der Axone, dem distalen Bereich, lokalisiert. Im Gegensatz dazu wird das ebenfalls axonspezifische R1-Antigen in proximalen sowie in distalen Teilen der Axone und in der Retina in frühen wie in späten Entwicklungsstadien gefunden. Seine Expression scheint nicht entwicklungsabhängig zu sein.

Moleküle, deren Vorkommen in Axonen zeitlich reguliert ist oder die im distalen Teil des wachsenden Axons und im Wachstumskegel vorkommen, sind von besonderem Interesse, da ein Axon am distalen Ende wächst und die Wechselwirkung des Wachstumskegels mit seiner Umgebung die Orientierung des Axons und damit den Ort funktioneller Verknüpfungen bestimmt.

Axonspezifische Proteine

Das R1-Antigen wird in der Retina vom Embryonaltag 5 bis zum Embryonaltag 14 gefunden (Abb.23). Die Menge des R1-Antigens verändert sich in der Retina wohl nicht stark, denn die Intensität der Anfärbung der optischen Faserschicht bleibt über diesen Zeitraum unverändert. Die Menge des in einem Axon vorkommenden Antigens ist nicht untersucht. Das Antigen

scheint im gesamten Axon und im Wachstumskegel vorzukommen, wie die Anfärbung von Axonen in Zellkultur zeigt. Die Bindungsstelle für den Antikörper ist wahrscheinlich intraaxonal lokalisiert, da *in vitro* gewachsene Axone mit Formaldehyd fixiert und damit permeabilisiert werden müssen, um sich anfärben zu lassen. Das R1-Antigen ist vermutlich ein Membranprotein, das bei Zellfraktionierungen durch differentielle Zentrifugation nahezu ausschließlich in der Membranfraktion vorkommt. Das R1-Antigen ist ein relativ verbreitetes, in vielen weiteren Fasertrakten außerhalb des retinotectalen Systems vorkommendes Molekül.

Das Auftreten des R2-Antigens in der Retina ist entwicklungsabhängig. In der E5-Retina wird es in Zellen und Axonen gefunden, in der E7-Retina ist das R2-Antigen ausschließlich in Axonen zu finden. Nasale und temporale optische Faserschicht erscheinen in der Immunfluoreszenz mit R2-Antikörper nahezu gleich stark gefärbt. Die symmetrisch zur Fissur auftretende Anfärbung der Axone am Embryonaltag 7 wird bis zum Embryonaltag 9 asymmetrisch, gefärbt ist nur noch die nasale optische Faserschicht der Retina, die temporalen Fasern sind nicht gefärbt. Der Unterschied in der Anfärbung der optischen Faserschicht am Embryonaltag 7 und 9 kommt durch eine Abnahme der Färbung von temporalen Axonen in der E9-Retina zustande und nicht durch eine verstärkte Färbung der nasalen Axone. Diese Annahme wird auch durch biochemische Untersuchungen unterstützt.

Die Frage, ob das R2-Antigen auf allen temporalen Axonen im Bereich der Fissur am Embryonaltag 9 schwächer vorkommt oder ob zahlenmäßig weniger, gleich stark gefärbte Axone vor-

handen sind, läßt sich durch die Untersuchung in Schnitten nicht abschließend beantworten. Wahrscheinlich ist jedoch, daß das R2-Antigen in allen Axonen schwächer vorkommt, da man auf E9-Retinaschnitten, die mit R2-Antikörper angefärbt sind, kaum einzelne, gefärbte Axone in der temporalen Retina findet. In noch späteren Entwicklungsstadien ist das Antigen auch in der nasalen Retina nicht mehr nachweisbar, im optischen Trakt und im Stratum opticum auf dem Tectum aber vorhanden. Das Antigen ist vorwiegend im distalen Bereich des Axons und schwächer im Wachstumskegel lokalisiert, wie die Färbung von in vitro kultivierten und mit dem R2-Antikörper gefärbten Axone zeigt.

Das Molekül ist intraaxonal lokalisiert, denn in Zellkultur gewachsene Axone müssen, um eine Markierung mit R2-Antikörper zu erhalten, zuvor fixiert werden. Die Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation unterstützt diese Annahme, da das Molekül im löslichen Kompartiment der Zellen gefunden wird. Es könnte von innen mit der Plasmamembran assoziiert sein, da das Antigen auch in der Membranfraktion gefunden wird. Das Protein ist wahrscheinlich nicht glykosyliert und hat ein Molekulargewicht von 160kDa. Das R2-Antigen ist ein sehr verbreitetes, während der Entwicklung axonaler Verbindungen im Nervensystem vorkommendes Molekül, das in frühen Stadien auch noch auf den Zellkörpern von Neuronen vorkommt.

Das R3-Antigen kommt in Axonen in der Retina ebenfalls entwicklungsabhängig vor. In der E5-Retina ist das Antigen nur auf Axonen zu finden, nicht jedoch auf Zellen. Das Vorkommen des R3-Antigens während der weiteren Entwicklung der Retina ist dem von R2-Antigen sehr ähnlich (Abb.23). In der E7-Retina

ist es in temporaler und nasaler optischer Faserschicht, in der E9-Retina nur noch in nasaler optischer Faserschicht und in der E14-Retina überhaupt nicht mehr zu finden. Die Markierung mit R3-Antikörper von E7- und E9-Retina zeigen, daß das R3-Antigen im Gegensatz zu R2-Antigen in sehr peripheren Bereichen der optischen Faserschicht zu finden ist. Das R3-Antigen kommt im Tectum nur in den retinalen Axonen vor, denn in mit R3-Antikörper gefärbten Tectumschnitten ist nur das Stratum opticum markiert. Das R3-Antigen kommt in Axonen und Wachstumskegeln vor, eine unterschiedliche Anfärbung der distalen und proximalen Bereiche des Axons wird nicht gefunden.

Der Antikörper bindet wahrscheinlich an ein intraaxonal gelegenes Proteinepitop eines Membranglykoproteins. In Zellkultur gewachsene Axone können erst nach Fixierung mit dem Antikörper angefärbt werden. Nach einer Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation wird das R3-Antigen vor allem in der Membranfraktion gefunden. Die Deglykosylierung einer gelösten Proteinfraktion aus E10-Tectum ist ohne Einfluß auf die Bindung des Antikörpers an das Antigen im Proteinblot, das Molekulargewicht des deglykosylierten Proteins ist jedoch um etwa 7kDa erniedrigt.

Aus den Untersuchungen wird geschlossen, daß das R3-Antigen ein nur in bestimmten Fasertrakten vorkommendes, mit dem Wachstum von Axonen assoziiertes Molekül ist.

Auch das R4-Antigen tritt in retinalen Axonen entwicklungsabhängig auf (Abb.23). Vermutlich ist es in retinalen Axonen am Embryonaltag 5 nur in geringen Mengen vorhanden, denn die optische Faserschicht der Retina ist kaum angefärbt. In der E7-Retina ist das Antigen vor allem in der temporalen

Halbretina zu finden, auf Axonen in der nasalen optischen Faserschicht ist es im zentralen Bereich vorhanden. Von den Axonen der E9-Retina besitzen fast ausschließlich die der nasalen Retinahälfte das Antigen, in Axonen aus der temporalen Halbretina kommt das Antigen nur in peripheren ventralen und dorsalen Bereichen vor. In noch späteren Stadien (E14) ist das Antigen nur noch schwach in der zentralen optischen Faserschicht zu finden. Das Antigen ist nicht homogen im Axon verteilt. In Zellkultur gewachsene und mit dem R4-Antikörper gefärbte Axone zeigen eine gepunktete Anfärbung. Das Antigen ist intraaxonal lokalisiert, da es erst nach Fixierung von Explantatfasern markiert werden kann und nach einer Fraktionierung von tectalem Gewebe durch differentielle Zentrifugation im löslichen Anteil der Zellen vorkommt.

Die R-Antigene werden wahrscheinlich im Perikaryon der Ganglienzellen synthetisiert, mit immunhistologischen Methoden jedoch nahezu ausschließlich in Axonen gefunden. Sie müssen daher im Perikaryon in wesentlich geringeren Mengen oder in anderer Form als im Axon vorkommen, da die Ganglienzellen nicht oder nur sehr schwach gefärbt sind. Über den Mengenunterschied kann keine Aussage gemacht werden.

Deutungsversuche

Elektrophoretische Untersuchungen der Proteinzusammensetzung von Axon und Perikaryon zeigen quantitative und qualitative Unterschiede zwischen diesen beiden Kompartimenten eines Neurons (Schloßhauer, 1985). Mit Hilfe der Antikörper R1-R4 lassen sich vier verschiedene Proteine nachweisen, die fast ausschließlich in Axonen vorkommen. Das R2-, R3- und R4-

Antigen wird in der Retina in einer zeitlich-räumlich geordneten Weise gefunden. Eine der zentralen Fragen ist, wovon das Auftreten und Verschwinden dieser Antigene in Axonen abhängt:

- von der Position der Ganglienzellen,
- vom Alter der Ganglienzellen oder des Axons,
- oder von der Lokalisation des Antigens innerhalb des Axons.

Einige Modellvorstellungen zur Entstehung der retinotectalen Projektion nehmen an, daß die Axone von Ganglienzellen eine Markierung tragen, die von ihrer Position in der Retina abhängt. Besonders attraktiv sind solche Modelle, die das gradierte Vorkommen eines Moleküls zur Markierung der Axone in einer Dimension benutzen (Gierer, 1981). Dabei wird eine monoton steigende Konzentration dieses Stoffes entlang einer intern festgelegten Achse angenommen. Das Vorkommen eines solchen Antigens könnte durch Anfärbung von *in vitro* gewachsenen Axonen aus retinalen Explantaten mit dem Antikörper gezeigt werden, da man in diesem System einzelne Axone aus definierten Positionen untersuchen kann. Die etwa gleiche Intensität der Anfärbung von *in vitro* gewachsenen nasalen und temporalen Axonen spricht gegen die Annahme, daß die Menge eines der R-Antigene von der Position der Ganglienzelle in der Retina abhängt.

Wie die Färbung von positionsspezifisch in Axonen auftretenden Molekülen *in vivo* in der Retina auf Schnitten aussehen würde, ist schwer abzuschätzen, da zu der positionsspezifischen Markierung des einzelnen Axons Überlagerung von zwei weiteren, voneinander unabhängigen Effekten käme. Zum einen entwickelt sich die Retina asymmetrisch, d.h. die Entwicklung

der temporalen ist der nasalen Retina zeitlich voraus. Außerdem sind auf gefärbten Schnitten im zentralen Bereich der Retina immer Mischungen verschieden markierter Axone vorhanden.

Ist das Auftreten eines Moleküls abhängig vom Alter des Axons, wäre infolge des Entwicklungsvorsprungs der temporalen gegenüber der nasalen Halbretina zunächst eine präferentielle Färbung der temporalen Retina wahrscheinlich. Später sollten dann nasale und temporale Retina ähnlich stark gefärbt sein, vorausgesetzt, das Molekül hätte eine hohe Lebensdauer oder würde nach Abbau durch Neusynthese ersetzt. In Explantaten würde man keine regiospezifische Anfärbung verschiedener Bereiche finden.

Ein Molekül, das präferentiell im jungen, distalen Bereich von Axonen vorkommt, würde zunächst stärker in der temporalen optischen Faserschicht, später prominent in der nasalen optischen Faserschicht zu finden sein. In ganz späten Stadien wäre es in der Retina überhaupt nicht mehr zu finden. Auf Explantaten wären keine Unterschiede in der regiospezifischen Anfärbung, sondern Unterschiede zwischen proximalem und distalem Bereich des Axons zu erwarten. Eine Realisierung dieser Verteilung eines Antigens in Axonen wäre dadurch möglich, daß das Molekül nur eine bestimmte Lebensdauer hat und nicht durch Neusynthese ersetzt wird. Das Vorkommen dieses Moleküls würde sich dadurch in Abhängigkeit von der Lebensdauer zunehmend vom Perikaryon in den distalen Bereich des Axons verschieben, d.h. es wäre vom Alter des Axons abhängig. Die Länge des im Axon gefärbten Bereiches würde von der Lebensdauer des Moleküls abhängen. Diese Interpretation steht

mit nahezu allen Beobachtungen über die R-Antigene in Übereinstimmung.

Die ähnliche Anfärbung von nasalen und temporalen Axonen in Zellkultur unterstützt die Annahme, daß es sich bei den untersuchten Antigenen nicht um Moleküle handelt, deren mengenmäßiges Vorkommen von der Position der Ganglienzelle abhängt. Dagegen sollten Moleküle, deren Vorkommen in Axonen altersabhängig ist, in allen Regionen in gleichen Mengen vorkommen, wenn man davon ausgeht, daß in Explantaten keine Regeneration von Axonen stattfindet (Hummler, 1985). Über die Intensität der Färbung einzelner Axone kann wegen der Beschränkung der Methode jedoch keine Aussage gemacht werden.

Untersuchungen über die Ausbildung der optischen Faserschicht in vivo zeigen, daß die temporale optische Faserschicht am Embryonaltag 4 und 5 eine größere Fläche als die nasale optische Faserschicht einnimmt (Goldberg und Coulombre, 1972; Halfter und Deiss, 1984). Der Unterschied von ca. 30% in der Fläche, die von den Axonen eingenommen wird, und der daraus abzuleitende Entwicklungsvorsprung reicht vermutlich jedoch nicht aus, um das spätere (E9) ausschließliche Auftreten der R2- und R3-Antigene in der nasalen Retinahälfte zu erklären. Es ist jedoch denkbar, daß die Fläche, die von Axonen eingenommen wird, kein gutes Maß für den Entwicklungsunterschied ist. Neue Ganglienzellen werden nicht nur in der Peripherie der Retina gebildet, und deshalb erscheint es möglich, daß die Neubildung von Axonen in der temporalen optischen Faserschicht wesentlich früher als in der nasalen optischen Faserschicht abgeschlossen wird. In Retina-Ganzpräparaten kann diese Annahme jedoch nicht untersucht werden, da

es keine Möglichkeit gibt, in vivo nur die jungen Axone darzustellen. Daher können Aussagen über das Auswachsen von Axonen zu noch späteren Zeiten nur aus Beobachtungen von Zellkulturen entnommen werden.

Aus Explantaten der Retina wachsen in vitro am Tag 7 aus der temporalen Retina nur noch im peripheren Abschnitt, aus der nasalen Retina in allen Bereichen Axone aus, während aus Explantaten der E6-Hühnerretina die Axone weitgehend symmetrisch auswachsen (Halfter, 1983).

Eine hohe Asymmetrie in der späten Entwicklung der Retina (ab E7) sieht man auch, wenn die Zellproliferation verschiedener Regionen der Retina untersucht wird (Dütting et al., 1983). Die Abnahme von Stammzellen, die weiter proliferieren, beginnt in einer Region, die temporal von der Fissur gelegen ist. Sie breitet sich von dort radiär aus und erreicht zunächst den temporalen Rand der Retina (E8). Aus diesen Versuchen kann keine Aussage darüber gemacht werden, welche Zellen zwischen E7 und E9 noch gebildet werden. Unter der Annahme, daß sich darunter auch noch Ganglienzellen befinden, findet man eine gute Übereinstimmung der Regionen, die am Tag E8 noch eine Zellproliferationsrate von über 20% aufweisen mit den in der Immunfluoreszenz mit R2-, R3- und R4-Antikörper am Tag E9 gefärbten Bereichen. Zusätzlich zu dem Ursprungsgebiet der Axone in der nasalen Peripherie ist die nasale optische Faserschicht bis zur Fissur gefärbt, d.h. Regionen, durch die die Axone peripherer Ganglienzellen zur Fissur wachsen. In der temporalen Halbretina gilt dasselbe für die peripheren dorsalen und ventralen Bereiche, die am Tag E8 ebenfalls noch Proliferationsraten von über 20% aufweisen.

Im Widerspruch zu der Erklärung, daß die R2-, R3- und R4-Antigene in unterschiedlichen Mengen entlang der proximodistalen Achse vorkommen, scheint die Beobachtung zu stehen, daß mit R2-Antikörper am Tag E9 kaum einzelne Axone in der temporalen optischen Faserschicht gefunden werden und daß die in vitro-Färbung von Axonen mit R3- und R4-Antikörper keine Unterschiede in der Färbung entlang eines Axons zeigen.

Die Abweichungen von der erwarteten in vitro-Färbung von R3- und R4-Antikörper wären dadurch zu erklären, daß ein längerer Abschnitt im Axon als mit R2-Antikörper markiert wird. In der temporalen optischen Faserschicht müßten dann am Embryonaltag 9 aber mehr gefärbte Axone zu finden sein als mit R2-Antikörper. Auf Schnitten ist das schwer zu überprüfen, da R3- und R4-Antikörper im Gegensatz zu R2-Antikörper einzelne Axone nicht so anfärben, daß einzelne Axone zu identifizieren sind. Zumindest für den R4-Antikörper findet man eine Übereinstimmung mit der Erwartung insofern, als die temporale Faserschicht insgesamt am Embryonaltag 9 noch eine schwache Färbung aufweist, einzelne Axone sind nicht aufgelöst.

In der E7-Retina ist nach Anfärbung mit R2-Antikörper auf Schnitten die optische Faserschicht nicht immer gleichmäßig gefärbt. Vor allem auf Schnitten der Horizontalebene aus peripheren dorsalen und ventralen Bereichen ist der dem Glaskörper benachbarte Bereich der optischen Faserschicht schwächer gefärbt als der den Ganglienzellen zugewandte Bereich. Dies steht im Widerspruch zu der Erklärung, daß das R2-Antigen vor allem im jungen, distalen Bereich von Axonen vorkommt, wenn man annimmt, daß Axone aus der peripheren Retina bevorzugt in der Nähe der vitrealen Basalmembran wachsen (S. Thanos, pers.

Mitt.). Diese Basalmembran grenzt die Retina zum Glaskörper hin ab. Die Ursache des Widerspruchs wurde nicht geklärt.

Das räumlich-zeitliche Muster des Auftretens der R2-, R3- und R4-Antigene in der Retina korreliert gut mit dem von Differenzierungsmarkern in anderen Schichten der Retina. Lucifer-Yellow, das vermutlich eine Subklasse der Amacrinzellen färbt, und FITC-Peanut Agglutinin, das präferentiell an die innere und äußere plexiforme Schicht bindet, treten zunächst auf der temporalen Seite und in der ventralen Retina vor der dorsalen Retina auf (Layer und Kotz, 1983; Liu et al, 1983).

Eine weitere, a priori nicht ganz unwahrscheinliche Möglichkeit, das altersabhängige Auftreten der R2-, R3- und R4-Antigene auf retinalen Axonen zu erklären, basierte auf der Annahme, daß der Abbau der Antigene in den Axonen induziert wird durch den Kontakt der Wachstumskegel mit tectalen Zellen. Die temporalen Axone, die früher die Retina verlassen und das Tectum erreichen, würden dann vor den nasalen Axonen diese Moleküle abbauen. Gegen diese Vermutung spricht aber die Anfärbung auf E10-Ganzkopfschnitten eines Huhns, dem am Tag E3 ein Tectum operativ entfernt worden war. Die ausschließliche Anfärbung der nasalen Axone wird am Tag E10 auch bei diesem Huhn in beiden Augen gefunden.

Ein Abbau des R2-, R3- und R4-Antigens infolge axonalen Kontakts mit tectalem Gewebe ist auch deshalb unwahrscheinlich, da es auf dem Tectum dann unmarkierte Axone geben sollte. Da am Embryonaltag 14 aber noch das gesamte Stratum opticum auf dem Tectum gefärbt ist, die Retina das R2-, R3- und R4-Antigen jedoch nicht mehr besitzt, erscheint es wenig

wahrscheinlich, daß einzelne Faserpopulationen auf dem Tectum selektiv das R2-, R3- und R4-Antigen verlieren.

Das Auftreten der R2-, R3- und R4-Antigene in der Retina ist mit dem Wachstum retinaler Axone korreliert. Die Antigene kommen außerdem bevorzugt im jungen, distalen Teil des Axons vor.

Wie Einbau und Umbau der R2- und R3-Antigene im Axon vollzogen werden, bleibt ungeklärt. Das Axon wächst durch Einbau neuen Materials in der Zone unmittelbar hinter dem Wachstumskegel, d.h. vermutlich müssen alle dafür benötigten Stoffe zunächst intraxonal vom Perikaryon an diese Stelle transportiert werden. Vermutlich gilt das auch für die R2-, R3- und R4-Antigene. Im älteren, proximalen Teil des Axons werden die Moleküle jedoch nicht mehr gefunden. Es sollte daher außer der Regulation des Einbaues der Moleküle im distalen Axon einen Mechanismus geben, der den Abbau im proximalen Teil des Axons regelt. Offen bleibt, ob die Moleküle durch anterograden Transport in den Wachstumskegel weiter verwendet werden oder nach retrogradem Transport im Perikaryon metabolisiert werden.

Völlig ungeklärt ist bisher die Funktion der R-Antigene. Proteine, die dem R3- und R4-Antigen in Vorkommen und Molekulargewicht sehr ähnlich sind, wurden auch von anderen Autoren beschrieben. In einer Wachstumskegelpräparation von fötalem Rattengehirn findet sich ein Protein mit Mr 46 kDa. Es kann als Substrat einer Ca^{2+}-/Calmodulin-abhängigen Kinase spezifisch phosphoryliert werden (Katz et al., 1985). In einer Synaptosomenpräparation aus Rattenhippocampus ist das Protein F1 enthalten (Mr 47 kDa), das ebenfalls durch Kinase C phos-

phorylierbar ist (Nelson und Routtenberg, 1985) und möglicherweise an verhaltensabhängiger synaptischer Plastizität beteiligt ist (Routtenberg et al., 1985).

Ob die R2- und R3-Antigene aktiv am Wachstum oder an der Ausbildung der topographischen Projektion retinaler Axone auf das Tectum beteiligt sind, ist nicht untersucht. Ob solche Untersuchungen leicht durchführbar sind, erscheint fraglich. Die zeitliche Ordnung des Wachstums retinaler Axone wurde zur Erklärung der retinotectalen Projektion benutzt (Rager, 1980). Sie erscheint jedoch nach neueren Experimenten, die die Existenz von Positionsinformationen im Tectum und ihre Erkennung durch retinale Wachstumskegel demonstrieren (Bonhoeffer und Huf, 1982), nicht ausreichend.

Bei der Anfärbung von *in vitro* gewachsenen Axonen werden mit keinem der R-Antikörper alle Axone markiert. Das ist sehr wahrscheinlich nicht durch die Diffusion der Antikörper durch die axonale Membran limitiert, da eine Permeabilisierung der Membran mit Hilfe von 0,1% Desoxycholat den Anteil der gefärbten Fasern nicht verändert. Die Bedeutung dieser durch die Art des Antigens definierten axonalen Subpopulationen ist ungeklärt. Es könnte sich dabei um Axone verschiedener Ganglienzelltypen handeln oder um Axone, die zusätzlich zum Tectum zu bestimmten, weiteren Projektionsarealen wachsen.

Das Auftreten und die räumliche Verteilung des R4-Antigens in der optischen Faserschicht zwischen den Embryonaltagen 7 und 9 ist dem der R2- und R3-Antigene sehr ähnlich (Abb.23). Es unterscheidet sich von den R2- und R3-Antigenen dadurch, daß es über E9 hinaus in geringen Mengen in der zentralen Retina erhalten bleibt.

Da das R4-Antigen intraaxonal lokalisiert ist und stark angereichert in Vesikeln im Axon vorzukommen scheint, ist es wahrscheinlich, daß dieses Molekül retrograd im Axon transportiert wird. Ob es aktiv oder passiv am axonalen Transport beteiligt ist, ist ungeklärt. Das R2-Antigen ist ebenfalls intraaxonal lokalisiert und scheint mit der Membran assoziiert zu sein. Denkbar ist, daß es sich um eine Zytoskelettkomponente des Axons handelt.

Vermutlich läßt sich das entwicklungsabhängige Auftreten der R2-, R3- und R4-Antigene auch in anderen Bereichen des Nervensystems zeigen. Ein gutes Untersuchungsobjekt wäre das Cerebellum, da es wie das retinotectale System ebenfalls eine hohe Ordnung aufweist und seine Entwicklung gut charakterisiert ist. Im Cerebellum treten am Embryonaltag 17 die R-Antigene im Gegensatz zur Retina in teilweise unterschiedlichen Bereichen auf (Abb.24). Sollte es sich zeigen, daß das Auftreten der R-Antigene auch zu anderen Zeiten auf bestimmte Regionen beschränkt ist, könnte das auf unterschiedliche Mechanismen bei der Entwicklung von axonalen Verbindungen in verschiedenen Bereichen des Nervensystems deuten.

Mit dem R1-Antigen wurde ein weiteres axonspezifisches Antigen gefunden, dessen Expression jedoch unabhängig von der Entwicklung zu sein scheint. Es kommt auch auf Axonen außerhalb des retinotectalen Systems vor, wird jedoch nicht im Perikaryon gefunden. Auch seine Funktion ist unbekannt. Der R1-Antikörper erscheint zur Untersuchung der Entwicklung von neuronalen Verbindungen gut geeignet, da er breite Speziesspezifität besitzt und das Antigen sehr früh in Axonen auftritt.

Immunisierung und Etablierung der Zellinien

Zur Herstellung von Antikörpern, die an den Glykosylanteil von Glykoproteinen binden, sollten Glykopeptide aus neuronalem Gewebe zur Immunisierung verwendet werden. Für eine solche Präparation stehen retinale Axone nicht in ausreichender Menge zur Verfügung, da die Menge der anfallenden Glykopeptide nur 0.1% des eingesetzten Materials beträgt. Deshalb wurde auf Gesamtgehirn zurückgegriffen. Die Präparation ergab eine Glykopeptidfraktion mit einem durchschnittlichen Kohlehydrat-Protein-Verhältnis von 2.5:1 und mit einem Molekulargewicht von ca. 6000Da (Abb.1). Sie schien damit groß genug für eine erfolgreiche Immunisierung ohne zuvor an größere Trägerproteine (KLH) gekoppelt werden zu müssen. Der R3-Antikörper, der aus einer Immunisierung mit Glykopeptiden hervorgegangen ist, erkennt das Proteinepitop eines Glykoproteins (Abb.17b). Über das Epitop, an das der Antikörper R1, der ebenfalls aus dieser Fusion stammt, bindet, kann noch keine sichere Aussage gemacht werden. Wegen der geringen Zahl der charakterisierten Antikörper ist es schwierig, die Epitopspezifität der untersuchten Antikörper auf der Basis der Immunisierung zu interpretieren. Denkbar ist, daß die Heterogenität der Glykopeptidpräparation im Kohlehydrat-Protein-Verhältnis groß ist und somit auch noch längere Polypeptidketten vorhanden sind, die als Immunogene wirken können. Es ist ferner möglich, daß durch die Auswahl von Antikörpern, die spezifisch Axone färbten, solche selektiert wurden, die Proteinepitope erkennen. Auch ist unbekannt, mit welcher Geschwindigkeit Polypeptide und Oligosaccharide in der Immuno-

genmischung metabolisiert werden. Eine Aussage über das Verhältnis der polypeptid- und kohlehydratspezifischen Antikörper bei der Immunisierung kann daher nicht gemacht werden. Die Immunpräsentation von Glykopeptiden sollte jedoch durch Koppelung an ein Trägerprotein (KLH) verbessert werden können.

Im optischen Trakt des Huhns vom Tag 9 der Embryonalentwicklung sind wachsende Axone und Wachstumskegel angereichert, Zellkörper sind nur in geringem Ausmaß vorhanden. Deshalb sollten auch Moleküle, die präferentiell in Axonen vorkommen, im optischen Trakt angereichert sein. In zwei Fusionen wurden daher mit optischem Trakt immunisierte Mäuse verwendet. Die Fusion der Lymphozyten erbrachte ca. 3% Kulturen, die einen Antikörper produzierten, der in der Immunfluoreszenz spezifisch und ausschließlich mit dem Immunogen reagierte (Tabelle 1). Weitere 13% der Primärkultur zeigten ebenfalls eine positive Immunfluoreszenz auf E7-Ganzkopfschnitten, wobei die Spezifität für retinale Axone sehr viel geringer war (Tab.1). Diese Hybridomlinien wurden in der Regel nicht weiter kultiviert.

Wieviele der faserspezifischen Antikörper aus den OT-Fusionen identisch sind, kann nur abgeschätzt werden. In der Immunfluoreszenz dominierten Antikörper mit breiter Spezifität für Axone. Ihre entwicklungsabhängige Expression scheint dem R1-Antigen zu entsprechen. Antikörper dieser Spezifität stellen etwa 25% der axonspezifischen Subpopulation dar. Ob die Antikörper identisch sind oder gegen unterschiedliche Epitope eines Moleküls, oder ob sie gegen verschiedene Moleküle gerichtet sind, ist nicht untersucht. Die restlichen axonspezifischen Antikörper sind wahrscheinlich nur in geringer Mul-

tiplizität vorhanden. Läßt man die Überlegungen zur Identität der Antikörper unberücksichtigt, erhält man durch die Immunisierung mit optischem Trakt gegenüber einer Immunisierung mit Glykopeptiden eine um den Faktor 6 höhere Ausbeute an faserspezifischen Zellinien.

In allen Fusionen überstieg die Anzahl der im Immunassay positiven Zellkulturüberstände die Menge der in der Immunfluoreszenz spezifisch färbenden antikörperhaltigen Überstände. Mögliche Ursachen sind ausführlich bei Saumweber (1980) diskutiert. Eine der Hauptfehlerquellen des Immunassays scheint die unspezifische Bindung von Antikörpern an die verwendeten PVC-Mikrotiterplatten zu sein. Obwohl Immunassays in Gegenwart von 0.5% Tween 80 gemacht wurden, um die unspezifische Bindung von Antikörpern an PVC zu reduzieren (Engvall, 1980), konnte die unspezifische Adsorption vermutlich nicht vollständig verhindert werden. Eine Standardisierung der Antikörperkonzentration im ELISA würde sicherlich Verbesserungen bringen (Frasch, 1981). Sie scheint aber wegen der dafür nötigen Zeit schwer durchführbar, da die Hybridomkulturen dann 3 Tage in der 0.2ml-Kultur gehalten werden müßten. Der dabei einsetzende Selektionsdruck könnte zum Verlust antikörperproduzierender Hybridome führen.

Die Fusion GP2 zeigte in Abweichung von den anderen Fusionen ein sehr schlechtes Wachstum. Nur in 30% der angelegten Kulturen wuchsen Hybridzellen (Tab.1). Besonders betroffen waren die Randfelder der Platten, die der Innenwand des Brutschrankes benachbart waren. Als Ursache für das schlechte Wachstum dieser Fusion wird daher die am Tag vor der Fusion durchgeführte Reinigung des Brutschrankes mit Spitacid

vermutet. Bei den anderen Fusionen lag diese Reinigung des Brutschrankes immer mehrere Tage vor dem Fusionstermin und in über 90% der angelegten Kulturen fanden sich Hybridomzellen.

Der Anteil der in der Immunfluoreszenz positiven Kulturen betrug bei den OT-Fusionen 16%, d.h. Mischungen von Hybridomlinien in den primären Kulturgefäßen haben die Selektion von Antikörpern durch Untersuchung in der Immunfluoreszenz wahrscheinlich wenig beeinträchtigt (De Blas et al., 1981). Ein Hauptproblem bei der Sicherung der positiven Kulturen stellte aber die Abtrennung von unproduktiven, wachsenden Hybridomzellen dar, die mit 70% den Hauptteil der Kulturen ausmachten. Dazu wurden die positiven Kulturen zweimal durch Verdünnen kloniert. Wegen des hohen Anteils faserspezifischer Antikörper bei der Fusion OT1/2 konnten aus Zeitgründen einige Kulturen, die in der zweiten Klonierung beim Test der ersten 8 Zellkulturüberstände keine spezifische Färbung in der Immunfluoreszenz aufwiesen, nicht als Linie etabliert werden.

Ausblick

Alle beschriebenen Antikörper erkennen intraxonale Epitope. Im Falle des R1- und R3-Antigens ist das Antigen vermutlich in der Membran lokalisiert. Die Funktion dieser Antigene sollte sich mit weiteren monoklonalen Antikörpern oder Antiseren gegen das Antigen durch *in vitro*-Versuche näher eingrenzen lassen.

Bei der Suche nach Antikörpern, die Zelloberflächenmoleküle von Axonen erkennen, sollte ein weiterer Selektionsschritt der Zellkulturüberstände durch Färbung auf vitalen Axonen die Ausbeute an Zelloberflächenantigenen erhöhen.

Ein Nachteil dieses Tests wäre, daß Antikörper gegen ein intraaxonales Epitop eines Membranproteins dabei nicht gefunden würden. Eine stärkere Anreicherung von Zelloberflächenmolekülen und die Verbesserung der Immunpräsentation sollten ebenfalls die Charakterisierung weiterer, auf Axonen vorkommenden Moleküle ermöglichen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe monoklonaler Antikörper wurden vier Proteine identifiziert, die im retinotectalen System bevorzugt in retinalen Axonen vorkommen. Drei dieser Proteine treten entwicklungsabhängig in Axonen auf. Diese Proteine kommen bis zum Embryonaltag 7 in Axonen aus temporaler und nasaler Retina, dagegen ab Embryonaltag 9 fast ausschließlich in nasalen Axonen vor. In späten Entwicklungsstadien (E14) sind diese Proteine in der Retina kaum noch nachweisbar. Ihr entwicklungsabhängiges Auftreten in retinalen Axonen macht es wahrscheinlich, daß sie bevorzugt im distalen Teil des Axons vorkommen. Immunhistologische Untersuchungen in anderen Geweben und die Charakterisierung der Antigene im Proteinblot zeigen, daß es sich um verschiedene Moleküle handelt.

Ein weiteres axonspezifisches Protein wird beschrieben, dessen Expression in Axonen nicht entwicklungsabhängig ist.

Die von den Antikörpern erkannten Epitope liegen intraaxonal, die Antigene sind jedoch zumindest teilweise mit der axonalen Plansmamembran assoziiert.

VII. LITERATUR

Babiel, R.: Biochemische und immunologische Untersuchung eines Proteins, das am Wachstum von Axonen retinaler Ganglienzellen des Huhns beteiligt ist. Diplomarbeit, Universität Tübingen, 1983.

Beug, H., Gerisch, G., Kempff, S., Riedel, V. und Cremer, G.: Specific inhibition of cell contact formation in Dictyostelium by univalent antibodies. Exptl. Cell Res. 63, 147-158 (1970).

Bonhoeffer, F. und Huf, J.: In vitro expriments on axon guidance demonstrating an anterior-posterior gradient on the tectum. EMBO J. 1, 427-431 (1982).

Bonhoeffer, F. und Huf, J: Position-dependent properties of retinal axons and their growth cones. Nature 315, 409-410 (1985).

Cowan, M. und Hunt, R.K.: The development of the retinotectal projection: An overview. In: Molecular Basis of Neural Development, pp. 389-428 (1985, G. Edelman, W.E. Gall und W.M. Cowan, Hrsg.).

Crossland, W.J., Cowan, W.M., Rogers, L.A. und Kelly, J.P.: The specification of the retino-tectal projection in the chick. J. Comp. Neur. 155, 127-164 (1974).

De Blas, A.L., Ratnaparkhi, M.V. und Mosimann, J.E.: Estimation of the number of monoclonal hybridomas in a cell fusion experiment. Effect of post-fusion cell dlution on hybridoma survival. J. Immunol. Meth. 45, 109-115 (1981).

Dütting, D., Gierer, A. und Hansmann, G.: Self-renewal of stem cells and differentiation of nerve cells in the developing chick retina. Dev. Brain Res. 10, 21-32 (1983).

Edelman, G.M.: Cell adhesion and the molecular process of morphogenesis. Am. Rev. Biochem. 54, 135-169 (1985).

Engvall, E.: Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. In: Methods in Enzymology, Vol. 70, pp.419-439 (1980, H. van Vunakis, J. J. Langone, Hrsg.).

Evan, G.: A simple and rapid solid phase enzyme-linked immunoadsorbance assay for screening monoclonal antibodies to poorly soluble proteins. J. Immunol. Meth. 73, 427-435 (1984).

Fazekas de St. Groth, S. und Scheidegger, D.: Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. J. Immunol. Meth. 35, 1-21 (1980).

Feizi, D.: Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. Nature 314, 53-57 (1985).

Finne, J. und Krusius, T.: Preparation and fractionation of glycopeptides. In: Methods in Enzymology, Vol. 83, pp. 269-277 (1982, V. Ginsburg, Hrsg.).

Frasch, M.: Monoklonale Antikörper gegen Drosophila-Proteine aus Kernfraktionen: Untersuchungen zur Antikörperspezifität und Antigenverteilung. Diplomarbeit, Universität Tübingen (1981).

Gierer, A.: Development of projections between areas of the nervous system. Biol. Cybern. 42, 69-78 (1981).

Goding, J.W.: Antibody production by hybridomas. J. Immunol. Meth. 39, 285-308 (1980).

Goldberg, S. und Coulombre, A.J.: Topographical development of the ganglion cell fiber layer in the chick retina. A whole mount study. J. Comp. Neur. 146, 507-518 (1972).

Halfter, W.: Explantate der embryonalen Vogelretina als in-vitro Modell axonaler Orientierung im entstehenden Zentralnervensystem von Vertebraten. Dissertation, Universität Tübingen (1983).

Halfter, W., Claviez, M. und Schwarz, U.: Preferential adhesion of tectal membranes to anterior embryonic chick retina neurites. Nature 292, 67-70 (1981).

Halfter, W. und Deiss, S.: Axon growth in embryonic chick and quail retinal whole mounts in vitro. Dev. Biol. 102, 344-355 (1984).

Henke-Fahle, S.: Monoklonale Antikörper gegen Oberflächenkomponenten neuronaler Zellen. Dissertation, Universität Tübingen (1983).

Henke-Fahle, S. und Bonhoeffer, F.: Inhibition of axonal growth by a monoclonal antibody. Nature 303, 65-67 (1983).

Holt, C.E.: Does timing of axon outgrowth influence initial retinotectal topography in Xenopus? J. Neurosci. 4, 1130-1152 (1984).

Hummler, E.: Untersuchungen zur Orientierung und zur Regenerationsfähigkeit junger Axone in der embryonalen Hühnerretina. Diplomarbeit, Universität Tübingen (1985).

Katz, F., Ellis, L. und Pfenninger, K.H.: Nerve growth cones isolated from fetal rat brain. III. Calcium-dependent protein phosphorylation. J. Neurosci. 5, 1402-1411 (1985).

Kearney, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B. und Rajewsky, K.: A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secretinghybrid cell lines. J. Immunol. 123, 1548-1550 (1979).

Köhler, G. und Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497 (1975).

Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970).

Layer, P.G. und Kotz, S.: Asymmetrical developmental pattern of uptake of lucifer yellow into amacrine cells in the embryonic chick retina. Neurosci. 9, 931-941 (1983).

Landis, S.C.: Neuronal growth cones. Ann. Rev. Physiol. 45, 567-580 (1983).

Letourneau, P.C.: Cell-substratum adhesion of neurite growth cones, and its role in neurite elongation. Exp. Cell Res. 124, 127-138 (1979).

Liu, L., Layer, P.G. und Gierer, A.: Binding of FITC-coupled peanut-agglutinin (FITC-PNA) to embryonic chicken retina reveals developmental spatio-temporal pattern. Dev. Brain Res. 8, 223-229 (1983).

Macagno, E.R.: Cellular interactions and pattern formation in the development of the visual system of Daphnia magna (Crustacea, Branchiopoda). II. Induced retardation of optic axon ingrowth results in a delay in laminar neuron differentiation. J. Neurosci. 1, 945-955 (1982).

Metcalf, D.: Hemopoietic colonies. In vitro cloning of normal and leukaemic cells. In: Recent Results in Cancer Research, No. 61, pp.15-17 (1977). Springer, Heidelberg.

Nelson, R.B. und Routtenberg, A.: Characterization of protein F1 (47 kDa, 4.5 pI): A kinase C substrate directly related to neural plasticity. Exptl. Neurol. 89, 213-224 (1985).

Pfenninger, K.H. und Maylié-Pfenninger, M.F.: Lectin labeling of sprouting neurons. I. Regional distribution of surface glycoconjugates. J. Cell Biol. 89, 536-546 (1981).

Pfenninger, K.H., Maylié-Pfenninger, M.F., Friedman, L.B. und Simkowitz, P.: Lectin labeling of sprouting neurons. III. Type-specific glycoconjugates on growth cones of different origin. Dev. Biol. 106, 97-108 (1984).

Pontecorvo, G.: Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. Somatic cell genetics 1, 397-400 (1975).

Rager, G.: Die Ontogenese der retinotopen Projektion. Naturwissenschaften 67, 280-287 (1980).

Rathjen, F.G. und Schachner, M.: Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. EMBO J. 3, 1-10 (1984).

Rylatt, D.B. und Parish, C.R.: Protein determination on an automatic spectrophotometer. Anal. Biochem. 121, 213-214 (1982).

Schloßhauer, B.: Axonale Zelladhäsions- und Glykoproteine während der Neuroembryogenese. Dissertation, Unversität Tübingen (1985).

Simpson, I.A. und Sonne, O.: A simple, rapid and sensitive method for measuring protein concentration in subcellular membrane fractions prepared by sucrose density ultracentrifugation. Anal. Biochem. 119, 424-427 (1982).

Spiro, R.G.: Analysis of sugars found in glycoproteins. In: Methods in Enzymology, Vol. 8, pp. 3-26 (1966a, E.F. Neufeld und V. Ginsburg, Hrsg.).

Spiro, R.G.: Characterization of carbohydrate units of glycoproteins. In: Methods in Enzymology, Vol. 8, pp.26-32 (1966b, E.F. Neufeld und V. Ginsburg, Hrsg.).

Springer, W.R. und Barondes, S.H.: Protein-linked oligosaccharide implicated in cell-cell adhesion in two Dictyostelium species. Dev. Biol. 109, 102-110 (1985).

Symmons, P.: A methodological investigation of production, purification and assay of monoclonal and polyclonal antibodies and their utilisation for quantitative, comparative and functional analysis of components of the eukaryotic nucleus. Dissertation Universität Tübingen (1984).

Valentino, K.L., Winter, J. und Reichardt, C.F.: Applications of monoclonal antibodies to neuroscience research. Ann. Rev. Neurosci. 8, 199-232 (1985).

LEBENSLAUF

Reiner B a b i e l

3.2.1955	geboren in Sigmaringen, Eltern: Otto Babiel und Olga Babiel geb. Stauß
1961-1965	Besuch der Volksschule Winterlingen
1965-1974	Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasiums Ebingen
1974	Reifeprüfung
1974-1976	Wehrdienst in Calw
1976-1983	Studium der Biochemie, Universität Tübingen
1982	Diplomhauptprüfung
1982-1983	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Virusforschung (jetzt MPI für Entwicklungsbiologie), Tübingen, in der Abteilung von Prof. Dr. F. Bonhoeffer
seit 1983	Doktorarbeit in derselben Abteilung.

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann
E. Bayer
F. Bonhoeffer
A. Gierer
K. Grell
M. Hanack
D. Mecke
F.F. Seelig
W. Voelter
G. Weitzel
U. Weser